

Preparação e caracterização de hidrolisados proteicos de tilápia

Vanessa Ferreira de Sousa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador(es): Engenheiro Irineu Batista
Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa
Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa
Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigador Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Agradecimentos

Ao Engenheiro Irineu Batista pela orientação, conhecimentos transmitidos, pelos incentivos e conselhos essenciais prestados ao longo deste trabalho.

À Engenheira Carla Pires pelo ensinamento de técnicas laboratoriais, bem como conhecimentos inerentes às mesmas.

Ao Engenheiro Carlos Cardoso pelos conhecimentos estatísticos transmitidos e disponibilidade prestada.

À Engenharia Ortênsia Nunes pelos dados fornecidos essenciais para a realização do trabalho.

À Professora Luisa Louro por toda a orientação, incentivo e simpatia que demonstrou ao longo de todo o percurso.

Às minhas colegas, amigos, namorado e muito especialmente aos meus pais por toda a paciência e apoio ao longo do meu trabalho, sem os quais não teria sido possível a elaboração deste trabalho.

Resumo

Os subprodutos gerados na filetagem de tilápia (*Oreochromis niloticus*) resultantes do corte 'V' são ricos em proteínas, sendo muitas vezes eliminados sem qualquer aproveitamento. Para a valorização deste material produziram-se hidrolisados proteicos (HP) por processos enzimáticos. Assim, os objetivos deste trabalho foram: preparar HP com 1% de Alcalase, 1% de Flavourzyme e Alcalase (0,5%) + Flavourzyme (0,5%), a 50°C, pH 7,5, durante 2h e avaliar as atividades antioxidantes (capacidade inibidora do DPPH[•] e ABTS^{•+}, poder redutor e atividades quelantes do cobre e do ferro) e inibidora da α -amilase.

O teor proteico destes hidrolisados foi: 84,1% (HP AI, HP AF) e 86,1% (HP FI) e o grau de hidrólise foi: 22,62 \pm 0,39% (HP AI), 30,27 \pm 1,42% (HP AF) e 31,20 \pm 0,60% (HP FI). A maior capacidade inibidora do DPPH[•] foi obtida nos HP FI e HP AF (EC_{50} =1,94 \pm 0,05 mg/mL e 2,00 \pm 0,02 mg/mL). O HP AF exibia a maior capacidade inibidora do ABTS^{•+} (EC_{50} =2,01 \pm 0,15 mg/mL) relativamente aos HP AI e HP FI (EC_{50} =2,72 \pm 0,20 mg/mL e EC_{50} =3,10 \pm 0,07 mg/mL, respetivamente). O HP AF exibia o menor poder redutor ($AC_{0,5}$ =6,68 \pm 0,07 mg/mL). A maior atividade quelante do Fe²⁺ verificou-se nos HP FI e HP AF (EC_{50} =7,97 \pm 0,26 mg/mL e 9,09 \pm 0,71 mg/mL, respetivamente), tal como na capacidade quelante do Cu²⁺ no HP AF (EC_{50} =0,84 \pm 0,02 mg/mL). A maior capacidade inibidora da α -amilase foi registada no HP FI (EC_{50} =6,57 \pm 0,56 mg/mL) seguido do HP AI, enquanto o HP AF apresentava uma atividade muito baixa.

O HP AF foi o hidrolisado que apresentou de forma geral, uma maior atividade antioxidante, evidenciando a formação de uma maior percentagem de péptidos exibindo esta atividade. Os resultados obtidos sugerem também que a atividade da Flavourzyme teria sido relevante na formação destes péptidos. Porém, tal não se verificou no que respeita a atividade inibidora da α -amilase.

Palavras-Chave: hidrolisados proteicos; atividade anti-radicalar, atividade quelante, poder redutor; atividade inibidora da α -amilase.

Abstract

The byproducts generated in the filleting of tilapia (*Oreochromis niloticus*) namely those, resulting from the 'V' cut are rich in proteins but they are often discarded without any use. The production of enzymatic protein hydrolysates (HP) is an alternative technology for upgrading this raw material. Thus, the objectives of this work were to prepare HP using 1% Alcalase, 1% Flavourzyme or Alcalase (0.5%) + Flavourzyme (0.5%), at 50°C, pH 7.5, for 2h to evaluate their antioxidant activities (inhibitory capacity of DPPH[•] and ABTS^{•+}, reducing power and chelating activities of copper and iron) and α -amylase inhibitory activity.

The protein content of these hydrolysates was: 84.1% (HP AI, HP AF) and 86.1% (HP FI) and the degree of hydrolysis was: 22.62 \pm 0.39% (HP AI), 30.27 \pm 1.42% (HP AF) and 31.20 \pm 0.60% (HP FI). The highest inhibitory capacity of DPPH[•] was obtained in HP FI and in HP AF (EC₅₀=1.94 \pm 0.05 mg/mL and 2.00 \pm 0.02 mg/mL). HP AF exhibited higher inhibitory capacity of ABTS^{•+} (EC₅₀=2.01 \pm 0.15 mg/mL) than HP AI and HP FI (EC₅₀=2.72 \pm 0.20 mg/mL and EC₅₀=3.10 \pm 0.07 mg/mL, respectively). HP AF had the lowest reducing power (AC_{0.5}=6.68 \pm 0.07 mg/mL). The highest Fe²⁺ chelating activity was observed in HP FI and in HP AF (EC₅₀=7.97 \pm 0.26 mg/mL and 9.09 \pm 0.71 mg/mL, respectively), as well as in Cu²⁺ chelating capacity, in HP AF (EC₅₀=0.84 \pm 0.02 mg/mL). The higher α -amylase inhibitory capacity was registered in HP FI (EC₅₀=6.57 \pm 0.56 mg/mL) followed by HP AI, whereas HP AF had very low activity.

It may be generally concluded that HP AF exhibited the highest antioxidant activity, suggesting the presence of a higher level of peptides in this hydrolysates with this activity.. The results also suggest that the activity of Flavourzyme would have been relevant in the formation of these peptides. However, this positive effect was not observed in the case of the α -amylase inhibitory activity.

Keywords: protein hydrolysates; antiradical activity; chelating activity; reducing power; α -amylase inhibitory activity.

Índice

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de Abreviaturas.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1. Indústria do Pescado: subprodutos e importância.....	1
1.2. Valorização de subprodutos de peixe.....	2
1.3. Preparação de HP por via enzimática.....	2
1.4. Caracterização química dos HP.....	6
1.5. Atividades Biológicas dos HP.....	10
1.5.1. Atividade antioxidante.....	10
1.5.2. Atividade anti-hipertensiva.....	13
1.5.3. Regulação da atividade hormonal e estimulação do crescimento.....	15
1.5.4. Atividade antimicrobiana.....	16
1.5.5. Atividade imunomoduladora e anti-inflamatória.....	17
1.5.6. Atividade anticancerígena.....	18
1.5.7. Atividade antiobesidade.....	20
1.5.8. Atividade antidiabética.....	21
1.5.9. Outras atividades biológicas.....	22
1.7. Objetivos.....	26
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1. Materiais.....	26
2.2. Métodos.....	27
2.2.1. Preparação dos HP.....	27
2.2.2. Caracterização dos HP.....	28
2.2.2.1. Determinação do teor de azoto.....	28
2.2.2.2. Determinação do GH.....	29
2.2.3. Atividades biológicas.....	30
2.2.4. Tratamento Estatístico.....	38
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Teor proteico dos HP.....	38
3.2. Grau de hidrólise dos HP.....	40
3.3. Atividade Antioxidante dos HP.....	42
3.3.1. Capacidade de inibição do DPPH [•]	42
3.3.2. Capacidade de inibição do ABTS ^{•+}	45

3.3.3. Poder Redutor.....	47
3.3.4. Capacidade de quelante do ferro (Fe^{2+})	49
3.3.5. Capacidade de quelante do cobre (Cu^{2+})	51
3.4. Capacidade de inibição da α -amilase.....	53
4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro.....	57
5. Referências Bibliográficas	59

Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição química típica de HP de pescado (adaptado de Batista et al., 2006).	7
Tabela 2 - Composição em aminoácidos dos HP de pescado expressa em g de aminoácidos/ 100g de proteínas e as suas correspondentes abreviaturas (Windsor et al., 1981; Mackie, 1982).	8
Tabela 3 - Atividade antioxidante de HP de subprodutos de pescado (tabela adaptada de Zamora-Sillero et al., 2018).	13
Tabela 4 - Péptidos identificados com atividade inibidora da ACE.	15
Tabela 5 - Péptidos identificados com atividade antimicrobiana, antiproliferativa, antidiabética e anti inflamatória.	23
Tabela 6 - Aplicações de HP de pescado baseadas em Justia Patentes.	25
Tabela 7 - Teor proteico dos hidrolisados preparados com Alcalase (HP AI) Flavourzyme (HP FI) e Alcalase+Flavourzyme (HP AF).	39
Tabela 8 - Grau de hidrólise dos hidrolisados preparados com Alcalase (HP AI) Flavourzyme (HP FI) e Alcalase+Flavourzyme (HP AF).	41
Tabela 9 - Valores de EC ₅₀ da inibição do DPPH [•] pelos HP.	43
Tabela 10 - Valores de EC ₅₀ da inibição do ABTS ^{•+} pelos HP.	46
Tabela 11 - Valores de AC _{0,5} respeitantes ao poder redutor dos HP.	48
Tabela 12 - Valores de EC ₅₀ da capacidade quelante do Fe ²⁺ pelos HP.	50
Tabela 13 - Valores de EC ₅₀ da capacidade quelante do Cu ²⁺ pelos HP.	53
Tabela 14 - Valores de IC ₅₀ da capacidade inibidora da α -amilase pelos HP.	54
Tabela 15 - Valores do teor proteico, do GH e dos EC ₅₀ , AC _{0,5} e IC ₅₀ dos HP.	56

Índice de Figuras

Figura 1- Perfil peptídico de hidrolisados de peixe obtidos com diferentes concentrações de Pellvit C (produto comercial constituído por uma mistura de enzimas proteolíticas com activadores e apresentando atividade entre os valores de pH 8,5 e 11,0) obtido por cromatografia de exclusão molecular.	9
Figura 2- Perfil peptídico de HP obtidos com enzima tripsina em função do tempo de hidrólise: 20, 40, 60, 120 min (Slizyte et al., 2016).	9
Figura 3- Diagrama da produção de hidrolisados proteicos através de hidrólise enzimática.	28
Figura 4 - Pesagem das amostras de EDTA para posterior determinação do teor de azoto.	29
Figura 5 - Diferentes constituintes do analisador LECO FP-528.	29
Figura 6 - Equação química relativa à inibição da α -amilase.	31
Figura 7 – Equação química referente à capacidade de eliminação do radical DPPH•.	33
Figura 8 - Equação química relativa à capacidade de eliminação do radical ABTS• ⁺	34
Figura 9 - Esquema representativo da atividade de quelação do cobre pelos HP.	36
Figura 10 - Esquema representativo da atividade de quelação do Fe ²⁺ por parte dos hidrolisados.	37
Figura 11 - Percentagem de inibição do radical DPPH• em função da concentração de HP AI, HP FL e HP AF.	43
Figura 12 - Percentagem de inibição do radical ABTS• ⁺ em função da concentração de HP AI, HP FL e HP AF.	46
Figura 13 - Poder redutor dos hidrolisados proteicos HP AI, HP FI e HP AF em função da concentração.	48
Figura 14 - Capacidade quelante do Fe ²⁺ pelos hidrolisados em função das respetivas concentrações (A). Valores de EC ₅₀ em função do tamanho médio dos péptidos dos HP (B).	50
Figura 15 - Capacidade quelante do Cu ²⁺ pelos hidrolisados em função das respetivas concentrações.	52
Figura 16 - Percentagem de inibição da α -amilase pelos hidrolisados em função das respetivas concentrações.	55
Figura 17 – Valores de EC ₅₀ e AC _{0,5} dos HP.	56

Lista de Abreviaturas

ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AC_{0,5} – concentração do hidrolisado que permite obter o valor de A=0,5 na determinação do poder redutor.

DPPH – α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo

DTT – ditioneitol

EC₅₀ – concentração de um produto que induz um efeito de metade do máximo (Half Maximal Effective Concentration)

IC₅₀ – metade da concentração inibidora máxima (Half Maximal Inhibitory Concentration)

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

HP – Hidrolisados Proteicos

HP AI – Hidrolisados Proteicos preparados com Alcalase

HP FI – Hidrolisados Proteicos preparados com Flavourzyme

HP AF – Hidrolisados Proteicos preparados com Alcalase+Flavourzyme

GH – Grau de hidrólise

IC₅₀ – concentração de um produto correspondente a metade da inibição máxima (Half maximal inhibitory concentration)

OPA – α -ftaldeído

PCL - tamanho médio dos péptidos

SDS – dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

1. Introdução

1.1. Indústria do Pescado: subprodutos e importância

O termo “pescado” designa todos os animais ou partes de animais marinhos ou de água doce, incluindo as suas gónadas femininas (ovas) e masculinas (leitugas) com exclusão dos mamíferos aquáticos, dos anfíbios e dos outros animais aquáticos abrangidos por regulamentação específica (Decreto-Lei nº 37/2004). No entanto, devido aos hábitos alimentares da população, normalmente só estão incluídos os peixes, crustáceos, moluscos e ciclóstomos que apresentam características bem particulares que os distinguem dos outros grupos do reino animal.

De acordo com o relatório da FAO (2016), a captura total de pescado em 2014 foi de 93,4 milhões de toneladas, em que as espécies de origem marinha atingiram 81,5 milhões de toneladas, tendo sofrido um ligeiro aumento relativamente aos dois anos anteriores. O consumo de pescado tem sido cada vez mais elevado graças ao vigoroso crescimento da aquacultura, que atualmente fornece metade de todos os peixes para consumo humano e a uma ligeira melhoria em algumas espécies de peixe devido a uma melhor gestão da pesca, e à preocupação crescente dos consumidores em seguir uma alimentação saudável, devido à sua composição química rica em proteínas de elevado valor biológico, ácidos gordos polinsaturados da série ω 3, vitaminas e micronutrientes. De entre as espécies de água doce, destaca-se a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) que é um peixe africano da família Cichlidae que se alimenta de plâncton e se consegue adaptar a uma vasta gama de habitats devido às suas características zootécnicas bem como ao facto de apresentar resistência a temperaturas extremas e stresse (Cabral *et al.*, 2012; Foh *et al.*, 2010). É atualmente cultivada em mais de 100 países sendo a segunda espécie mais cultivada depois da carpa (FAO, 2018). Os três principais produtores são a República Popular da China (1,78 milhões de toneladas), a Indonésia (1,12 milhões de toneladas) e o Egito (0,88 milhões de toneladas) e outros produtores líderes incluem Bangladesh, Vietname e Filipinas (FAO, 2017). É a sexta espécie mais cultivada a nível mundial (Reantaso, 2017) e uma das mais importantes a nível da crescente procura de fontes de proteína. A tilápia-do-Nilo foi introduzida no Brasil em 1971 e, segundo a Associação Brasileira de Piscicultura, a produção desta espécie representa 51,7 % da piscicultura brasileira, com uma produção de 357 639 t em 2017. Apenas cerca de 0,5 % da produção é exportada, maioritariamente para o mercado dos EUA que consome aproximadamente 478 500 t de tilápia por ano, estimando-se um consumo anual *per capita* de 1,5 kg

(Globefish, 2016). Segundo a FAO 2017, a produção de tilápia foi estimada em 5,67 milhões de toneladas em 2015 e deverá atingir 7,3 milhões de toneladas em 2030.

Algumas unidades processadoras de pescado das regiões do Oeste e Sudoeste do Paraná processam diariamente 112 250 kg de tilápia- do-Nilo, sendo os filetes o principal produto (MPA, 2013; Chidichima, 2014). A indústria de filetagem desta espécie gera diariamente um volume significativo de subprodutos constituídos por cabeças, barbatanas, vísceras, escamas e peles que constituem cerca de 65 % do peixe. Esta percentagem é semelhante à referida por Zamora-Sillero *et al.* (2018) que apontam um valor de 60 % da biomassa total.

1.2. Valorização de subprodutos de peixe

Os subprodutos gerados no processamento de pescado são ricos em proteínas (8 a 35 %, Sila *et al.*, 2016) e lípidos e são muitas vezes eliminados sem aproveitamento (Kristinsson e Rasco, 2000), provocando um grande impacto ambiental. Estes subprodutos podem ser utilizados na produção de concentrados e hidrolisados proteicos (HP), farinha e óleo de peixe (Sucasas, 2011), biodiesel e biogás (Cheerawit *et al.*, 2012), podendo também ser usados na indústria farmacêutica, médica e cosmética, como é o caso do colagénio. Este é bastante abundante e de fácil extração a partir dos organismos, é biocompatível bem como compatível com polímeros sintéticos e não é tóxico. No entanto o custo de preparação e purificação é elevado.

A produção de HP tem vindo a merecer grande atenção em virtude destes produtos apresentarem um maior valor acrescentado do que a farinha de peixe. Os HP de pescado são produtos obtidos de peixe inteiro ou de subprodutos, resultando da rotura de ligações peptídicas, por via química ou enzimática (Batista *et al.*, 2006). A produção de HP tem sido uma forma de reutilizar subprodutos de pescado pois possuem um conjunto de propriedades nutricionais e biológicas que lhes conferem um valor acrescentado em relação a outros tipos de produtos obtidos a partir desta matéria-prima.

1.3. Preparação de HP por via enzimática

Os HP podem ser preparados através de métodos químicos e biológicos. Os métodos químicos envolvem a hidrólise alcalina ou ácida. No entanto, a hidrólise química é difícil de controlar, ocorrendo em condições muito drásticas e podendo levar à racemização dos aminoácidos. Os rendimentos dos péptidos obtidos são heterogéneos e a qualidade nutricional é reduzida (Celus *et al.*, 2007). Os métodos bioquímicos usados na hidrólise das proteínas incluem a autólise e a hidrólise com adição de enzimas. Na autólise atuam enzimas proteolíticas endógenas (endo- e exo-

proteases) na hidrólise das proteínas. Os autolisados de pescado, mais conhecidos por ensilados, são preparados a partir de espécies subutilizadas ou subprodutos de pescado, recorrendo a uma tecnologia relativamente simples. Este processo envolve a moagem do pescado, a adição de um ácido, usualmente o ácido fórmico, e a homogeneização. Os ensilados de pescado podem ser também preparados com bactérias lácticas sendo necessário neste caso a adição de uma fonte de hidratos de carbono. Este produto é utilizado na alimentação animal, em particular na piscicultura. Trata-se de uma tecnologia especialmente adaptada ao processamento do pescado em zonas relativamente isoladas e dispondo de quantidades limitadas de matéria-prima, mas com capacidade para utilizarem os ensilados na alimentação animal. Todavia, os ensilados apresentam a desvantagem de a qualidade depender da atividade enzimática do pescado e da presença dos lípidos altamente insaturados e passíveis de sofrerem de forte oxidação com desenvolvimento de cheiros desagradáveis (Zamora-Sillero *et al.*, 2018). Na hidrólise com enzima(s) adicionada(s) não ocorrem alterações negativas nos aminoácidos, nem a formação de substâncias tóxicas, sendo o processo de hidrólise realizado em condições suaves e muito controladas (Guadix *et al.*, 2000). Os HP obtidos apresentam um valor nutricional semelhante ao das proteínas originais, mas exibem diversas atividades biológicas que não se manifestam nas proteínas intactas. Este processo permite obter produtos com grande reprodutividade em virtude das especificidades das enzimas utilizadas e do controlo das condições de hidrólise. Assim, as características pretendidas para o produto podem ser controladas com base na seleção da enzima e das condições deste processo (Kurozawa *et al.*, 2009). Porém, num processo industrial, na seleção da enzima devem ter-se também em consideração vários fatores que incluem, por exemplo, o preço, a disponibilidade no mercado e a garantia da repetibilidade da atividade enzimática. A hidrólise pode ser realizada por uma única enzima ou uma mistura de enzimas. Neste último caso, é mais frequente utilizar duas enzimas que podem atuar conjuntamente ou em sequência.

As proteases podem classificar-se de acordo com a constituição do seu centro activo, podendo ser de origem vegetal (papaína, bromelina, ficina), animal (pancreatina, tripsina, pepsina) ou microbiana (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme). Além disso as proteases comerciais utilizadas na produção de HP devem ser de grau alimentar e na sua selecção tem-se em conta a eficiência, factores económicos e características do produto pretendido.

O processo de produção de HP envolve a moagem da matéria-prima, adição de um certo volume de água, ajuste do pH e temperatura aos valores óptimos da enzima a utilizar, homogeneização e adição da(s) enzima(s). Durante a hidrólise, o pH é

corrigido de modo a mantê-lo, tanto quanto possível, próximo do valor ótimo da enzima. O controlo do pH pode ser feito manualmente ou recorrendo a um *pH stat*. A duração da hidrólise depende das características pretendidas para o produto. No final da hidrólise, a enzima é inativada por aquecimento térmico ou alteração do pH. A fração insolúvel é removida por centrifugação e o sobrenadante pode ser seco, por diferentes métodos.

Têm sido seguidas outras alternativas para a produção de HP que incluem o recurso a proteínas previamente solubilizadas, membranas de ultrafiltração, enzimas imobilizadas e processos fermentativos com leveduras ou bactérias proteolíticas.

No processo de produção de HP a partir de proteínas solubilizadas, procede-se à solubilização das proteínas em meio alcalino e posterior eliminação da fração de material não solubilizado. A hidrólise é realizada nas proteínas solubilizadas tendo em vista uma melhor acessibilidade da enzima às proteínas. Esta metodologia foi seguida por Raghavan e Kristinsson (2009) na preparação de HP de subprodutos de tilápia, cujas proteínas foram previamente solubilizadas a pH 11 e a hidrólise foi realizada com as enzimas Cryotin-F e Flavourzyme, tendo obtido HP com graus de hidrólise de 7,5 % e 25 %, respetivamente.

Geirsdottir *et al.* (2011) utilizaram um concentrado proteico de verdelho (*Micromesistius poutassou*), previamente solubilizado numa solução de NaOH, na preparação de HP com Alcalase, tendo obtido produtos com graus de hidrólise entre 2,5 % e 15 %. Estes autores concluíram que este método de preparação permitia obter HP com boas propriedades funcionais e biológicas. Num outro trabalho (Pires *et al.*, 2013) com subprodutos de pescada do Cabo (*Merluccius capensis*), foi seguido um método semelhante na preparação dos HP, a partir directamente das proteínas solubilizadas em meio alcalino. Este método permitiu obter um rendimento de 71,9 %, um pouco mais elevado do que o tradicional.

Nos processos convencionais em descontínuo a hidrólise enzimática torna-se muito dispendiosa, em virtude da enzima não ser reutilizada. Outros inconvenientes são ainda o tempo do processo, os elevados custos de trabalho, o baixo rendimento e produtividade, bem como a falta de uniformidade da qualidade. Assim, os reatores de membrana por ultrafiltração têm sido utilizados para ultrapassar estes problemas Roslan *et al.* (2018). Estes reatores permitem a produção contínua de sequências específicas de péptidos que são separados devido à diferença de pesos moleculares. Esta separação dos péptidos evita o contato com a enzima e a eventual inibição, contribuindo para melhorar a eficiência de bioconversão e aumentar o rendimento do processo. Cheftel *et al.* (1972) e Bhumiratana *et al.* (1977) utilizaram este tipo de reatores para a produção de HP a partir de concentrados proteicos de peixe, utilizando

respectivamente Monzyme e tripsina. Posteriormente, Bouhallab e Touzè (1995) aplicaram esta técnica para a recuperação de péptidos anti trombóticos. Bordenave *et al.* (1999) aplicaram esta técnica na hidrólise contínua de proteínas do soro de leite de cabra tendo obtido α -lactofina, um péptido com capacidade inibidora da ACE. Também Chiang *et al.* (2005) utilizaram um reator equipado com um sistema de fibras de ultrafiltração enroladas em espiral na hidrólise de concentrados de proteínas de soja, usando produtos comerciais de origem microbiana (Alcalase, Flavourzyme) ou ainda tripsina, quimotripsina e pepsina. As fibras de ultrafiltração utilizadas tinham valores de “cut-off” de 1, 10 ou 30 kDa. Estes autores verificaram que o sistema de produção em contínuo apresentava uma maior produtividade do que o sistema em descontínuo.

O recurso a enzimas imobilizadas na preparação de HP de pescado não é muito usual, embora apresente grande interesse na manutenção da estabilidade da enzima e da possibilidade da sua reutilização, ainda que a imobilização da enzima cause alguma redução da atividade. Alguns problemas que podem ser encontrados prendem-se com a autodigestão das proteases imobilizadas e problemas relativos à transferência e difusão de massa quando se utiliza líquidos viscosos. Lan *et al.* (2015) realizaram a inibição da ACE a partir de HP de peixe-lagarto (*Bathysaurus ferox*) quimicamente imobilizada em esferas magnéticas, tendo sido utilizada uma protease neutra. A sequência de aminoácidos do péptido com a atividade inibitória da ACE mais elevada foi identificada como GMKCAF e o seu IC₅₀ foi de $45,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$.

Guadix *et al.* (2006) apresentaram um processo para a produção de HP com baixa alergenicidade a partir de um concentrado proteico de soro usando uma protease bacteriana. Para tal, recorreram a um reator contínuo equipado com uma membrana de ultrafiltração com um “cut-off” de 3kDa. Este sistema permitiu obter elevados níveis de conversão (cerca de 80%), tendo havido uma forte redução da alergenicidade das proteínas (99,97%), sugerindo que pode ser incorporada em produtos alimentares para crianças e na alimentação entérica.

A utilização de estirpes bacterianas produtoras de exoproteases foi ensaiada na preparação de HP de pescado por Venugopal *et al.* (1989) na hidrólise de proteínas. Estes autores usaram quatro estirpes bacterianas com atividade proteolítica, imobilizadas em alginato de cálcio. Os melhores resultados foram obtidos com *Bacillus megaterium* que permitiram uma solubilização de 30% de azoto total após 24h de incubação. Martínez-Alvarez *et al.* (2008) seguiram uma abordagem semelhante, tendo usado *Saccharomyces cerevisiae* na hidrólise de hidrolisados de escamudo (*Pollachius virens*). Deste modo, obtiveram péptidos com uma atividade reguladora hormonal, cem vezes superior à dos péptidos iniciais. No trabalho de Jemil *et al.*

(2014) estudou-se também a preparação de hidrolisados fermentativos com *Bacillus subtilis* A26 a partir de várias espécies de peixe. Todos os hidrolisados exibiam atividade antioxidante e os preparados a partir de *Sardinella aurita* apresentavam a maior atividade antibacteriana.

Por último, Godinho *et al.* (2016) obtiveram hidrolisados fermentativos a partir de hidrolisados de bacalhau, usando *Bacillus sp.* isolados de amêijoia-japonesa (*Venerupis philippinarum*). Este processo permitiu obter hidrolisados que exibiam uma maior capacidade inibidora da ACE do que os hidrolisados iniciais.

1.4. Caracterização química dos HP

Na tabela 1 apresenta-se a composição química aproximada típica de HP de pescado. O teor de humidade depende do processo de secagem, conseguindo-se teores mais baixos no caso de produtos secos por liofilização, sendo também mais hidrofóbicos. O teor de proteínas depende da matéria-prima usada na preparação dos HP. No pescado usa-se o fator 6,25 para converter o teor de azoto em proteínas. Este fator tem sido também usado no caso dos HP, embora sejam constituídos por péptidos. Do mesmo modo, o teor de gordura dos HP é igualmente muito dependente da matéria-prima. Ainda que no processo de preparação dos HP ocorra a libertação parcial da gordura, os produtos obtidos a partir de espécies gordas apresentam frequentemente maiores teores de gordura do que os preparados a partir de espécies magras. O teor de cinza dos HP depende fundamentalmente do pH de preparação dos mesmos, sendo tanto mais elevado quanto mais se afaste da neutralidade. Nesse caso, torna-se necessário adicionar ácido ou base para ajustar o pH ao valor ótimo da atividade da enzima (Dong *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009).

Os constituintes minerais provêm do músculo do peixe, no entanto, durante o processo de hidrólise pode ser necessário corrigir o pH com a adição de um ácido (em geral HCl) ou de uma base (em geral, NaOH), levando a um aumento do teor de sais minerais dos HP.

O teor médio de aminoácidos de várias espécies de pescado apresenta-se na tabela 2. O perfil de aminoácidos dos HP reflecte o da matéria-prima original em virtude do processo de hidrólise se realizar em condições muito suaves (temperatura e pH). De acordo com Barreiros e David (2006), a grande maioria dos HP possui uma composição equilibrada de aminoácidos e uma elevada digestibilidade.

Tabela 1- Composição química típica de HP de pescado (adaptado de Batista et al., 2006).

Humidade (%)	3 – 8
Proteína (%)	70 – 87
Gordura (%)	2 - 3
Cinza (%)	2 - 9
Fósforo (%)	0,4 - 0,8
Cálcio (%)	0,1 - 0,8
Cloretos (%)	2 - 3
Ferro (mg/kg)	40 - 50

O grau de hidrólise dos HP é uma importante característica destes produtos e é definido como a percentagem de ligações peptídicas quebradas no processo hidrolítico. Assim, se o número de ligações hidrolisadas for h , então o grau de hidrólise é calculado a partir da expressão seguinte:

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \%$$

em que h_{tot} é o número total de ligações peptídicas numa proteína e exprime-se em miliequivalentes por grama de proteína (meq/g). h_{tot} depende das proteínas e pode ser calculado a partir do respectivo perfil de aminoácidos. No caso do pescado, o valor frequentemente utilizado é 8,6 meq/g proteína. (Adler-Nissen, 1986). O grau de hidrólise dá uma indicação da percentagem de ligações hidrolisadas, estando inversamente relacionado com o tamanho médio dos péptidos formados através aproximadamente da equação:

$$GH = \frac{1}{PCL} \times 100 \%$$

em que PCL é o comprimento médio da cadeia peptídica.

Os HP apresentam na sua constituição uma grande variedade e quantidade de péptidos, dependendo a sua distribuição, com base nas massas moleculares, da enzima utilizada e do tempo de hidrólise, podendo ser caracterizada por técnicas cromatográficas.

Na figura 1 apresenta-se o perfil peptídico genérico dos HP de pescado obtidos por cromatografia de exclusão molecular. Esta figura evidencia o efeito do tipo de enzima no perfil peptídico dos HP e na figura 2 está ilustrado o efeito da concentração de uma enzima na distribuição dos péptidos por massas moleculares, pelo que péptidos de

maior massa molecular, apresentam menores tempos de retenção. Neste tipo de cromatografia, os tempos de retenção dos diferentes péptidos variam inversamente com as respectivas massas moleculares.

Tabela 2 - Composição em aminoácidos dos HP de pescado expressa em g de aminoácidos/ 100g de proteínas e as suas correspondentes abreviaturas (Windsor et al., 1981; Mackie, 1982).

Aminoácido	Abreviatura do aminoácido	Símbolo do aminoácido	Concentração (g/100g de proteína)
Lisina	Lys	K	6,9 - 8,9
Metionina	Met	M	2,0 - 3,0
Cistina	Cys	C	0,7 - 1
Triptofano	Trp	W	0,6 - 1,2
Arginina	Arg	R	6,4 - 7,1
Teonina	Thr	T	3,5 - 3,9
Isoleucina	Ile	I	3,7 - 4,3
Leucina	Leu	L	6,0 - 7,1
Valina	Val	V	4,3 - 4,9
Histidina	His	H	1,8 - 2,1
Fenilalanina	Phe	F	2,4 - 3,7
Tirosina	Tyr	Y	2,5 - 3,3
Glicina	Gly	G	2,5 - 12,1
Ácido glutâmico	Glu	E	12,5 - 14,0
Ácido aspártico	Asp	D	8,5 - 8,8
Prolina	Pro	P	4,3 - 6,5
Serina	Ser	S	4,0 - 4,9
Alanina	Ala	A	6,2 - 7,3

Das características sensoriais dos HP, a que mais se destaca é o amargo, sendo uma desvantagem quando incorporado na alimentação humana. De acordo com Wu e Aluko (2007) esta característica pode ser atribuída a péptidos hidrofóbicos libertados na hidrólise. Para Nosho *et al.* (1985) o aumento do sabor amargo está relacionado com a localização de aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxílico da cadeia peptídica e de aminoácidos básicos no terminal amina. Para alterar ou eliminar esta característica sensorial têm vindo a ser desenvolvidos vários métodos tais como a adsorção dos péptidos amargos por carvão activado, extração seletiva com álcoois (FitzGerald e O'Cuinn, 2006) ou ainda a adição de polifosfatos, aminoácidos específicos (Asp e Glu), α -ciclodextrinas ou a mistura dos HP com proteínas não hidrolisadas.

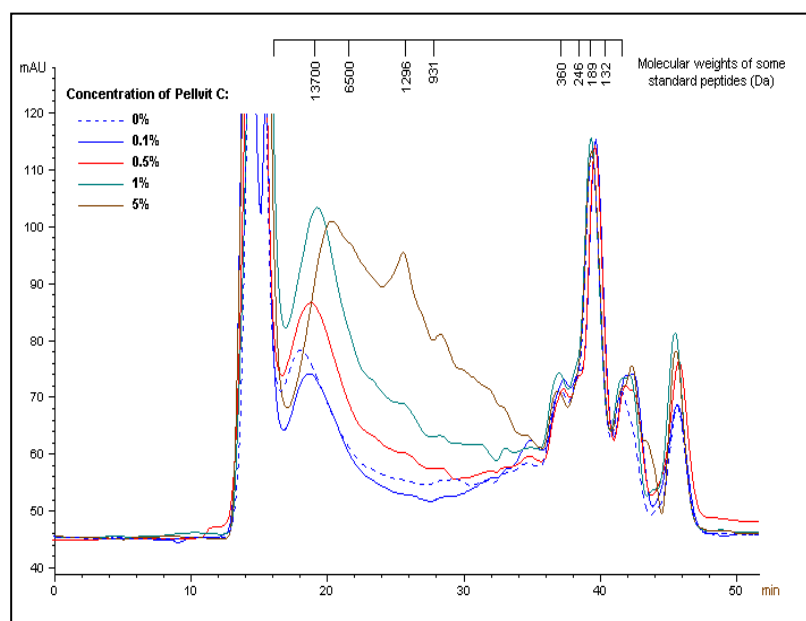


Figura 1- Perfil peptídico de hidrolisados de peixe obtidos com diferentes concentrações de Pellvit C (produto comercial constituído por uma mistura de enzimas proteolíticas com activadores e apresentando atividade entre os valores de pH 8,5 e 11,0) obtido por cromatografia de exclusão molecular.

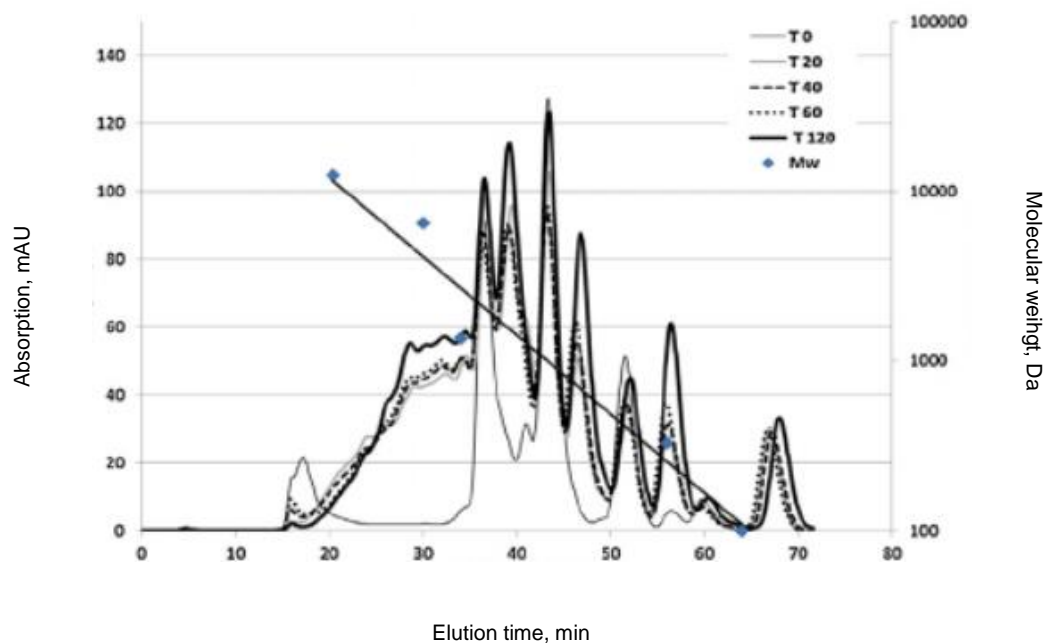


Figura 2- Perfil peptídico de HP obtidos com enzima tripsina em função do tempo de hidrólise: 20, 40, 60, 120 min (Slizyte et al., 2016).

Alguns métodos enzimáticos foram também testados, utilizando exopeptidases (amino-, carboxipeptidases e exopeptidases específicas de prolina), reações de transpeptidação (reação de plasteína) e formação de ligações cruzadas recorrendo a transglutaminase. Noguchi *et al.* (1975) isolaram vários oligopéptidos de HP com sabor ácido e Jao e Ko (2002) detectaram o sabor umami em HP de atum. A presença de lípidos nos HP pode conferir-lhes um cheiro a peixe acentuado (Hoyle e Merritt, 1994).

A cor dos HP varia desde tonalidades esbranquiçadas até castanho escuro, dependendo da matéria-prima e também da enzima utilizada. Por exemplo, Muzaifa *et al.*, (2011), verificaram que os HP de subprodutos de pescado preparados com Alcalase eram mais escuros do que os obtidos com Flavourzyme. Esta diversidade de cores pode ser devida à presença de pigmentos e também de lípidos. Durante o armazenamento pode ocorrer um escurecimento dos HP em virtude de reacções do tipo Maillard (Hoyle e Merritt, 1994).

1.5. Atividades Biológicas dos HP

Os HP de pescado possuem péptidos bioativos que são libertados por hidrólise durante a digestão (Batista, 2013). Estes péptidos estão presentes nas proteínas intactas, mas as propriedades que exibem só se manifestam quando não estão incorporados na sequência de aminoácidos das proteínas. Para comparar a atividade biológica de HP ou dos péptidos bioativos usa-se frequentemente o valor de IC₅₀, isto é, a concentração que inibe uma determinada atividade biológica em 50 %.

De entre as atividades biológicas dos HP, destacam-se as seguintes: atividade antioxidante, anti-hipertensiva, reguladoras da atividade hormonal, estimuladoras do crescimento, antiproliferativas de células cancerosas, imunoestimulantes, hipocolesterolémicas, antidiabéticas, antimicrobianas (antibacterianas, antivirais, antifúngicas, entre outras) e antiobesidade (Batista, 2013).

1.5.1. Atividade antioxidante

A produção de radicais livres no pescado ocorre por processos de autooxidação, processos enzimáticos e também como resultado do metabolismo celular ou por exposição a fatores exógenos (Barreiros *et al.*, 2006). O stresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e os mecanismos para a sua remoção. É a presença de radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio em excesso que determina a ocorrência de reações de oxidação causando danos oxidativos nos tecidos biológicos. No caso do pescado e subprodutos de pescado, a oxidação lipídica pode ocorrer de forma mais significativa devido à

presença de gordura com elevado conteúdo em ácidos gordos insaturados que são mais suscetíveis de sofrerem oxidação (Lin e Liang, 2002).

O efeito indesejável dos radicais livres pode ser combatido com antioxidantes, naturalmente presentes nos organismos ou com antioxidantes de origem exógena (Barreiros *et al.*, 2006). Os antioxidantes são geralmente utilizados para prevenir as reações de oxidação que causam alterações indesejáveis nos alimentos o que evita a formação de compostos tóxicos, odores e sabores indesejáveis prolongando assim o período de conservação dos produtos.

Os antioxidantes naturais têm sido cada vez mais utilizados devido ao facto de os antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propilo (PG) apresentarem efeitos negativos para a saúde (Shahidi *et al.*, 2007).

De alguns HP de pescado têm sido isolados e purificados péptidos que exibem elevada atividade antioxidante (Batista, 2011). No entanto, o mecanismo envolvido nesta atividade não é ainda bem conhecido, mas sabe-se que a presença de alguns aminoácidos aromáticos, bem como de ácido glutâmico e aspártico e aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina apresentam capacidade antioxidante, atuando como quelantes de iões metálicos devido aos grupos carboxilo e amino presentes nas cadeias laterais (Sarmadi e Ismail, 2010; Udenigw e Aluko, 2012). Para além do seu poder antioxidante, podem apresentar também um efeito sinérgico na presença de outros antioxidantes. Esta atividade antioxidante depende não só da natureza da matéria-prima utilizada mas também da enzima e do grau de hidrólise (GH).

Os diferentes resíduos de aminoácidos podem ter papéis específicos na atividade antioxidante dos péptidos, podendo ser por quelação de metais de transição e/ou eliminação de radicais livres.

Foh *et al.* (2010) prepararam HP a partir do músculo da tilápia cru e cozido, previamente secos e pulverizados, usando proteases comerciais (Alcalase, Neutrase e Flavourzyme). Os HP obtidos com Alcalase apresentavam o GH mais elevado (cerca de 25 % após 80 min de hidrólise) e exibiam a maior atividade antiradicalar (DPPH e ABTS) e quelante do ferro.

Zhang *et al.* (2012) obtiveram HP a partir de gelatina da pele de tilápia com as proteases comerciais Properase E e Multifect neutra. As condições ótimas de hidrólise de cada protease foram determinadas recorrendo ao método ortogonal. Prepararam também HP com as duas enzimas em simultâneo ou consecutivamente. Os HP com maior GH ($22,11 \pm 0,19$ %) foram preparados pela hidrólise sucessiva destas enzimas. Estes HP apresentavam a maior capacidade inibidora dos radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$),

peróxido (O_2^{\cdot}) e DPPH $^{\cdot}$. Estes autores identificaram os peptídeos EGL e YGDEY que apresentavam valores de EC_{50} de 4,61 μ g/mL e 6,45 μ g/mL, respetivamente.

Os HP do músculo de tilápia preparados com Alcalase apresentavam maior inibição do radical DPPH do que os obtidos com Termolisina (Daud *et al.*, 2014), porém estes últimos eram mais eficientes na eliminação do radical ABTS. Estes autores verificaram ainda que as atividades antirradicais dos HP obtidos com estas enzimas diminuíam quando o tempo de hidrólise passava de uma para duas horas.

A gelatina extraída de pele de tilápia-do-Nilo foi utilizada na preparação de HP recorrendo a diversas proteases (bromelina, papaína, tripsina, Flavourzyme, Alcalase e neutrase). Estes HP foram fracionados por ultrafiltração e a atividade antioxidante dos peptídeos com massas moleculares inferiores a 10 kDa foi avaliada por vários métodos (Choonpicharn *et al.*, 2015). A atividade destes HP dependia da enzima utilizada, apresentando os preparados com Flavourzyme um maior poder inibidor do ABTS e prevenção da oxidação do ácido linoleico. Os preparados com Alcalase tinham um maior poder redutor e os HP obtidos com bromelina possuíam a maior atividade quelante do ferro.

No trabalho de Yarnpakdee *et al.* (2015) prepararam também HP de músculo de tilápia-do-Nilo usando Alcalase, Flavourzyme, Protamex e papaína. A hidrólise foi realizada nas proteínas previamente solubilizadas a pH 11, tendo sido obtidos HP com grau de hidrólise até 40%. Os HP preparados com Alcalase e com maior grau de hidrólise apresentavam a maior atividade antioxidante. Aos HP preparados com Alcalase, foi adicionada papaína, tendo-se verificado que os novos HP apresentavam maior atividade inibidora do ABTS e de quelação do ferro. Por outro lado, estas atividades eram reforçadas após a digestão simulada destes HP, verificando-se ainda que peptídeos com massas moleculares de 513 Da e 1484 Da exibiam os valores mais elevados daquelas duas atividades. Além disso, os HP preparados com Alcalase e papaína eram menos amargos do que os obtidos apenas com Alcalase, tornando-os mais adequados para incorporação em produtos alimentares.

Por último, Bernardi *et al.* (2016) avaliaram a atividade antioxidante por vários métodos (ORAC, FRAP e TEAC) de HP desta espécie produzidos com Alcalase e durante vários tempos de hidrólise. Porém, estes HP, com diferentes GH, não apresentavam diferenças de atividade antioxidante.

Além dos trabalhos referidos anteriormente, em que se utilizaram subprodutos de tilápia, indicam-se na tabela 3 outros trabalhos sobre HP preparados a partir de outras espécies nos quais se identificaram os peptídeos responsáveis pela atividade antioxidante.

Tabela 3 - Atividade antioxidante de HP de subprodutos de pescado (tabela adaptada de Zamora-Sillero et al., 2018).

Espécie	Origem	Enzima(s)	Atividade(s) Antioxidante(s)	Sequências purificadas	Referência
Salmão (espécie não indicada)	Barbatana peitoral	Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsina, tripsina	ABTS, DNA ⁽¹⁾ , DPPH [•]	FLNEFLHV	Ahn <i>et al.</i> (2014)
Cangulo azul (<i>Navodon septentrionalis</i>)	Cabeças	Papaína	DPPH [•] , ABTS, [•] O, H ₂ O ₂ ^{••}	WEGPK, GVPLT, GPP	Chi <i>et al.</i> (2015b)
Raia (<i>Raja porosa</i>)	Cartilagem	Tripsina, Alcalase	DPPH [•] , ABTS, [•] OH, O ₂ ^{••}	FIMGPY, GPAGDY, IVAGPQ	Pan <i>et al.</i> (2016)
Tintureira (<i>Prionace glauca</i>)	Gelatina da pele	Protamex	DPPH, [•] OH	Frações com maior capacidade antioxidante: EGR, GPR, GY, GF e quatro aminoácidos R, L, Y e F	Weng <i>et al.</i> (2014)
Carpa-do-limo (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Pele	Alcalase	DPPH, ABTS, [•] OH	PYSFK, GFGPEL, VGGRP	Cai <i>et al.</i> (2015)
Gaiado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Ovas	Alcalase	ABTS, [•] OH, O ₂ ^{••} , Quelação do Fe ²⁺	DWMKGQ, MLVFAV, MCYPAST, FVSACSVAG, LADGVAAPA, YVNDATLLR, DLDLRKDLYNA	Intarasirisawat <i>et al.</i> (2013)
Tubarão-martelo-recortado (<i>Sphyrna lewini</i>)	Músculo	Papaína	[•] OH, ABTS, O ₂ ^{••} , DPPH	WDR, PYFNK	Wang <i>et al.</i> (2012)
Atum-rabilho (<i>Thunnus thynnus</i>)	Músculo	Orientase, Properase XXIII	DPPH	LPTSEAAKY, PMDYMVT	Hsu (2010)
Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Gelatina da pele	Alcalase, Pronase E, tripsina, pepsina	DPPH, [•] OH, O ₂ ^{••}	DPALATEPF	Ngo <i>et al.</i> (2010)
Hoki	Carcaça	Pepsina, tripsina, papaína, α-quimotripsina, Alcalase, Neutrase	DPPH, [•] OH, O ₂ ^{••} , RO ₂ [•]	ESTVPERTHPACP, DFN	Kim <i>et al.</i> (2007)

1.5.2. Atividade anti-hipertensiva

De acordo com o relatório de 2016 da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte em todo o mundo, estimando-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2012 e representaram 31% de todas as mortes globais. Dessas mortes, estima-se que 7,4 milhões foram devido a doença cardíaca coronária e 6,7 milhões a acidente vascular

cerebral (WHO, 2016). Os péptidos anti-hipertensivos atuam na redução da tensão arterial inibindo a ação da enzima conversora da angiotensina-I (ACE). Esta enzima catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II e inativa um vasodilatador (bradicinina), resultando num aumento da tensão arterial (Lee e Hur, 2017).

Embora vários inibidores sintéticos da ACE como o enalapril, alacepril, ou lisinopril inibam a atividade desta enzima, apresentam no entanto, efeitos secundários, tais como inflamações, tosse seca, perturbação do paladar, erupções na pele ou edema angioneurótico (Intarasirisawat *et al.*, 2013).

Os HP de tilápia obtidos por Raghavan e Kristinsson (2009) com Cryotin e Flavourzyme apresentavam uma significativa atividade inibidora da ACE, mas não havia diferenças entre os produtos obtidos por estas enzimas. Porém, os HP com maior GH exibiam uma maior atividade. Por outro lado, verificaram também que as diferentes frações destes HP obtidas por ultrafiltração, apresentavam uma atividade inibidora semelhante à dos HP não fraccionados.

Roslan *et al.* (2014) avaliaram a atividade inibidora da ACE por HP preparados com Alcalase a partir de subprodutos da filetagem de tilápia. Estes autores obtiveram uma inibição de 88,26 % com uma concentração de 94 mg/mL, tendo atribuído esta atividade à presença de péptidos com massa molecular < 5kDa.

Choonpicharn *et al.* (2015) estudaram a atividade inibidora da ACE a partir da pele de tilápia com várias enzimas (bromelina, papaína, tripsina, Flavourzyme, Alcalase, Neutrase), sendo o HP preparado com papaína, o que apresentava maior GH ($59,55 \pm 0,014$ %). Os HP obtidos com tripsina e Flavourzyme e massas moleculares inferiores a 10 kDa tinham uma potente atividade inibidora da ACE.

Thuanthong *et al.* (2017) purificaram e caracterizaram péptidos inibidores da ACE de colagénio de tilápia produzidos com Alcalase num reator enzimático, dispondo de uma membrana com um “cutoff” de 1 kDa. O HP foi caracterizado relativamente ao tamanho dos péptidos, atividade inibidora da ACE e estabilidade à digestão gastrointestinal simulada. Este HP apresentava um IC_{50} de 1,2 mg/mL cuja atividade foi ligeiramente reduzida após digestão gastrointestinal. Este HP foi fraccionado tendo sido identificados cinco novos péptidos que exibiam atividade inibidora da ACE.

Tal como no caso da atividade antioxidante, apresentam-se na tabela 4 referências a trabalhos sobre HP obtidos a partir de subprodutos de outras espécies, em que foram identificados os péptidos responsáveis pela inibição da ACE.

Tabela 4 - Péptidos identificados com atividade inibidora da ACE.

Espécie	Origem	Enzima(s)	Sequências purificadas	Referências
Peixe lagarto (<i>Saurida elongata</i>)	Músculo	Protease neutra	RVCLP	Wu <i>et al.</i> (2015)
Linguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	Músculo	Papaína, pepsina, tripsina e kojizyme	MEVFVP VSQLTR	Ko <i>et al.</i> (2016)
Gaiado (<i>Katsuwana pelamis</i>)	Ovas	Alcalase	DWMKGQ MLVFAV MCYPAST FVSACSVAG LADGVAAPA YVNDAAATLLPR DLDLRKDLYAN	Intarasirisawat <i>et al.</i> (2013)
Salmão (espécie não indicada)	Barbatanas peitorais	Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, pepsina, Protamex, tripsina	VWDPPKFD FEDYVPLSCF FNVPLYE	Ahn <i>et al.</i> (2012)
Raia-oirega (<i>Okamejei kenojei</i>)	Gelatina da pele	Alcalase, flavourzyme, Neutrase, Protamex	MVGSAPGVL LGPLGHQ	Ngo <i>et al.</i> (2014)
Bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>)	Gelatina da pele	Pepsina + tripsina + α -quimotripsina	LLMLDNDLPP	Himaya <i>et al.</i> (2012)
Cação liso (<i>Mustelus mustelus</i>)	Víscera	Esperase	IAGPPGSAGPAG VVPFEGAV PLPKREE DSFEGLQQ	Abdelhedi <i>et al.</i> (2017)

1.5.3. Regulação da atividade hormonal e estimulação do crescimento

A presença nos HP de péptidos hormonais ou reguladores de atividade hormonal tem sido referida em vários trabalhos dado o seu significado, em particular para a produção aquícola. Assim, no trabalho de Cancre *et al.* (1999) foram detetados fatores de crescimento, compostos que, entre outras funções, têm a capacidade de estimular o crescimento e a diferenciação celular, nas frações de HP de camarão (*Pandalus borealis*), bacalhau (*Gadus morhua*) e sardinha (*Sardina pilchardus*) com maiores massas moleculares. Porém, as frações destes HP com massas moleculares menores exibiam atividade secretagoga de gastrina e colecistocinina (CCK). Estas hormonas apresentam um largo espetro de atividades biológicas tais como o controlo da mobilidade intestinal e a secreção de enzimas digestivas.

Fouchereau-Péron *et al.* (1999) detetaram péptidos do tipo do CGRP (Péptido Relacionado com o Gene da Calcitonina) em HP de sardinha e camarão. O CGRP é um neuropéptido que se encontra no sistema nervoso central, onde atua como

neurotransmissor, e no sistema cardiovascular, sendo um potente vasodilatador. Posteriormente, Rousseau *et al.* (2001) purificaram e avaliaram as atividades biológicas de um péptido do tipo do CGRP, presente num HP de sardinha, com uma massa molecular de 6000 Da. Martínez-Alvarez *et al.* (2007) identificaram moléculas do tipo CGRP em HP comerciais de carrocho (*Centroscymnus coelolepsis*). Estes péptidos foram purificados e apresentavam uma massa molecular entre 1500-2500 Da. A atividade de um péptido do tipo CRGP foi também avaliada num HP de escamudo o qual foi purificado e parcialmente sequenciado, apresentando alguma homologia com a α -actina e a miosina de várias espécies de peixes (Martínez-Alvarez *et al.*, 2008).

A produção de fatores de crescimento ou de secretagogos (gastrina e CCK) foi detetada em HP de bacalhau (Ravallec-Plé *et al.*, 2000). Estes péptidos bioativos foram detetados em todas as frações dos HP e avaliadas as respetivas atividades. Os autores concluíram ainda que o processo de hidrólise desempenha um papel muito importante na obtenção destes péptidos, em particular, o tempo de hidrólise. Num outro trabalho, (Ravallec-Plé *et al.*, 2000) detetaram também péptidos secretagogos, fatores de crescimento e do tipo CGRP em HP de sardinha, tendo verificado que estas atividades em diferentes frações dos HP dependiam das massas moleculares dos péptidos. De igual modo, Ravallec-Plé e Van Wormhoudt (2003) verificaram que extratos e HP de cabeças de camarão (*Penaeus aztecus*) e do músculo de bacalhau possuíam péptidos secretagogos (gastrina e CCK).

1.5.4. Atividade antimicrobiana

O desenvolvimento microbiano, em conjunto com as alterações bioquímicas e enzimáticas, é geralmente responsável pela deterioração de produtos alimentares (Silva, 2014). Os péptidos antimicrobianos possuem complexos mecanismos de ação relacionados com a interação com o agente microbiano, afetando as membranas celulares, ou partes internas como a replicação do DNA ou a síntese de proteínas, ou ainda interagindo com o hospedeiro com funções imunomoduladoras da membrana, regulação do processo inflamatório e cicatrização (Téllez *et al.*, 2010). Estes péptidos são constituídos por cadeias de aminoácidos com peso molecular abaixo de 10 kDa que geralmente contêm entre 12 e 50 aminoácidos, dos quais quase metade são hidrofóbicos (Najafian e Babji, 2012). Quase todos os péptidos antimicrobianos de peixes possuem atividades com estirpes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser utilizados como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, imunomoduladores e antitumorais (Kim *et al.*, 2010; Rajanbabu *et al.*, 2011).

HP preparados a partir de subprodutos de tilápia e usando Protamex, apresentavam atividade antimicrobiana contra *Yersinia ruckeri*, e em menor grau, contra *Edwardsiella tarda* e *Bacillus megaterium* (Robert *et al.*, 2015).

Zhang *et al.* (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de HP de ostra (*Crassostrea gigas*) preparados com três proteases comerciais. Os HP apresentavam atividade antibacteriana contra alguns microrganismos patogênicos, tanto para o homem como para estirpes marinhas de *Vibrio*, com exceção de *Vibrio anguillarum*. Estes autores verificaram também que os péptidos com maior GH exibiam maior atividade antimicrobiana. Também Abdelhedi *et al.* (2016) verificaram que vários HP de vísceras de cação (*Mustellus mustellus*) apresentavam diferentes graus de atividade antibacteriana contra estirpes Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica*).

Wald *et al.* (2016) verificaram que HP obtidos a partir das vísceras de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exibiam atividade antibacteriana contra várias estirpes Gram-positivas e Gram-negativas. Esta atividade dependia consideravelmente do GH, registrando-se a maior atividade nos HP com 30 % de GH. A maior atividade antibacteriana foi detetada contra *Flavobacterium psychrophilum* e *Renibacterium salmoninarum*.

1.5.5. Atividade imunomoduladora e anti-inflamatória

Vários estudos têm vindo a mostrar que os HP ou péptidos com atividades imunomoduladoras podem ser produzidos a partir de uma variedade de fontes de proteínas. Entre várias enzimas utilizadas, as que intervêm mais na produção de péptidos imunomoduladores a partir de fontes de proteína como o pescado, são a tripsina, Alcalase e pepsina (Chalamaiah *et al.*, 2018). Os péptidos derivados de alimentos com efeitos imunomoduladores são pequenos (2-10 resíduos) e hidrofóbicos, sendo estes componentes maioritariamente aminoácidos como Gly, Val, Leu, Pro, Phe, aminoácido carregado negativamente, Glu, aminoácido aromático, Tyr (Chalamaiah *et al.*, 2018).

A inflamação é uma resposta biológica complexa do organismo a uma infeção ou lesão dos tecidos. A ativação dos macrófagos constitui uma parte importante do início de reações defensivas, sendo libertados mediadores inflamatórios pelos macrófagos, como o óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias [interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α)] e a prostaglandina E₂ (PGE₂), para melhorar a capacidade de defesa. No entanto, a ativação excessiva de

macrófagos tem efeitos prejudiciais, como o choque séptico, que pode levar à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e à morte. Assim, a modulação da ativação dos macrófagos constitui uma boa estratégia para prevenir os efeitos indesejáveis.

Os péptidos bioativos presentes nos HP têm demonstrado efeitos moduladores contra as reações inflamatórias ao inibir a produção daqueles marcadores pró-inflamatórios, bem como a proteína inflamatória sintase do óxido nítrico e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Kim *et al.*, 2016).

Karnjanapratum *et al.* (2016) mostraram que hidrolisados de gelatina extraída da pele de *unicorn leatherjack* (*Aluterus monoceros*) apresentavam potencial imunomodulador ao reduzir a produção de isoleucina IL-6 e IL-1 β e de óxido nítrico em células de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS).

Os HP de gelatina da pele de perca-gigante (*Lates calcarifer*) apresentavam potencial imunomodulador ao reduzir significativamente a produção de IL-6 e IL-1 β em células de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS (Sae-leaw *et al.*, 2016).

No estudo realizado por Ahan *et al.* (2012) em peptonas de subprodutos de salmão verificou-se que a fração com péptidos com massas moleculares entre 1000 e 2000 Da exibia atividade anti inflamatória. Estes péptidos inibiam a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias que incluíam TNF- α , IL-6 e IL-1 β em células de macrófagos RAW264.7. Também os HP de *sweetfish* (*Plecoglossus altivelis*), em particular os preparados com tripsina e α -quimotripsina, inibiam significativamente a produção de óxido nítrico, interleucina-6 (IL-6) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em células de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS (Sung *et al.*, 2012).

Kim *et al.* (2016) verificaram a fração com péptidos de massas moleculares superiores a 5 kDa dos HP de mexilhão (*Mytilus edulis*) preparados com pepsina, que apresentava a maior atividade inibidora do óxido nítrico e inibia a secreção de PGE₂ pelos macrófagos RAW264.7. Por outro lado, a estimulação dos macrófagos com LPS induzia a produção de citocinas pró-inflamatórias, mas o tratamento com esta fração peptídica suprimia esta produção de citocinas.

1.5.6. Atividade anticancerígena

Estima-se que, em 2012 e a nível mundial, 14,1 milhões de pessoas foram diagnosticadas com cancro, o que provocou mais de 8,2 milhões mortes (Ferlay *et al.*, 2015). No mercado encontram-se muitos fármacos com atividade anticancerígena, mas apresentam efeitos secundários tóxicos e elevado custo (Gertsch *et al.*, 2011). Além disso, a maioria dos fármacos imunomoduladores não são apropriados para usos crónicos ou preventivos (Wang *et al.*, 2010).

A atividade antiproliferativa de 18 HP preparados a partir de várias espécies de peixes foi medida em duas linhas de células cancerígenas da mama (Picot *et al.*, 2006). Dez destes HP apresentavam uma significativa atividade inibidora destas linhas celulares, mas os péptidos responsáveis por esta atividade não foram identificados.

No trabalho de Song *et al.* (2011) verificou-se que HP de *scaly hairfin anchovy* (*Setipinna taty*) preparados com pepsina exibiam atividade antiproliferativa de células cancerosas da próstata (DU-145), pulmão (1299) e esôfago (109) e também que esta atividade era reforçada nos HP após esterilização a 121 °C durante 15 min.

You *et al.* (2011) procederam ao fracionamento por ultrafiltração de HP de *loach* (*Misgurnus anguillicaudatus*) obtidos com papaína. Verificaram que a fração com massas moleculares inferiores a 3 kDa exibia a maior atividade antiproliferativa de células cancerosas do fígado (HepG2), da mama (MCF-7) e do cólon (Caco-2). Além disso, os resultados sugeriam que os HP com maior capacidade de eliminação do radical oxigênio (ORAC) apresentavam também maior atividade antiproliferativa.

HP de gelatina de lula gigante (*Dosidicus gigas*) obtidos com Esperase apresentavam o maior efeito citotóxico de células cancerígenas com valores de IC₅₀ de 0,13 e 0,10 mg/mL, respetivamente para as linhas celulares MCF7 (carcinoma da mama) e U87 (glioma) (Aleman *et al.*, 2011).

Hsu *et al.* (2011) prepararam HP a partir do músculo escuro de atum usando papaína e protease XXIII, uma endopeptidase produzida por *Aspergillus melleus*. Os resultados obtidos mostraram que as frações dos HP com massas moleculares entre 390 e 1400 Da apresentavam a maior atividade antiproliferativa de células MCF-7. Foram identificados os péptidos LPHVLTPEAGAT e PTAEGGVYMT responsáveis por esta atividade com valores de IC₅₀ de 8,1 e 8,8 µM, respetivamente.

Num estudo realizado por Umayaparvathi *et al.* (2014) avaliou-se a atividade anticancerígena do péptido LANAK isolado de HP de ostra (*Saccostrea cucullata*). Este péptido apresentava atividade anticancerígena contra as células do carcinoma do cólon (HT-29), considerando os autores que este péptido poderia ser utilizado como um ingrediente eficiente em aplicações farmacêuticas e nutracêuticas.

As proteínas presentes na água de cozedura do atum nas fábricas de conservas foram usadas por Hung *et al.* (2014) como matéria-prima para a preparação de HP com a protease XXIII. Estes HP exibiam atividade antiproliferativa de células MCF-7 (linha celular do cancro da mama), em particular a fração com massas moleculares acima de 2,5 kDa. Esta fração provocava também a apoptose das células, tendo sido identificados os péptidos KPEGMDPPLSEPEDRRDGAAGPK e KLPPLLLAKLLMSGKLLAEPCTGR responsáveis por esta atividade.

Os HP preparados a partir de ovas de *rohu* (*Labeo rohita*) com pepsina apresentavam atividade antiproliferativa de células cancerosas do cólon Caco-2 que dependia da concentração do hidrolisado, atingindo o máximo de inibição de $65 \pm 13,9$ % com a concentração de 9 mg/mL (Chalamaiah *et al.*, 2015). Porém, os HP preparados com tripsina não exibiam nenhuma atividade antiproliferativa significativa.

Sae-leaw *et al.* (2016) avaliaram também a atividade antiproliferativa dos HP de gelatina de perca-gigante, utilizando linhas celulares humanas do cancro do cólon (Caco-2) e do fígado (HepG2). A inibição da proliferação celular dependia da concentração na gama de 1 a 25 mg/mL. O HP preparado durante e após a extracção de gelatina com uma concentração de Alcalase de 2 unidades/g apresentava o maior efeito antiproliferativo das células Caco-2 (20 %), enquanto a maior redução do crescimento das células HepG2 (39 %) foi conseguida com o HP preparado a partir da gelatina extraída com a mesma concentração de enzima. As diferenças de atividade antiproliferativa dos HP foram atribuídas pelos autores à diferente composição da membrana celular, fluidez e área superficial dos dois tipos de células.

1.5.7. Atividade antiobesidade

A hiperlipidemia consiste na presença de altos níveis de lípidos na corrente sanguínea que incluem ácidos gordos, colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos e triglicéridos, e é uma das muitas causas de doenças cardiovasculares (Jain *et al.*, 2007). A obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, diabetes tipo II, tensão arterial sistémica, doenças cardiovasculares, dislipidemia e aterosclerose (Roh *et al.*, 2012).

Liu *et al.* (2013) optimizaram as condições enzimáticas para a produção de HP que exibiam atividade contra a obesidade a partir de proteínas solúveis em água, recorrendo à metodologia da superfície de resposta. Os melhores resultados foram obtidos com alcalase alcalina que, nas condições optimizadas de hidrólise (pH 11, 39 °C, 122 U/mL, 10 h), levou à obtenção de HP que exibiam atividade inibidora da lipase ($53,04\% \pm 1,32\%$) e da α -amilase ($20,03 \pm 0,89\%$).

Jemil *et al.* (2017) estudaram os efeitos hipolipidémicos, anti obesidade e cardioprotetor de HP fermentados de sardinela (*Sardinella aurita*) em ratos Wistar. A ingestão diária de farinha ou de HP de sardinela incorporados numa ração com elevado valor calórico provocou uma redução dos níveis séricos de colesterol total, triglicéridos, colesterol das LDL e um aumento do colesterol das HDL. Os HP também diminuíram o teor hepático de triglicéridos, de colesterol e diminuíram a atividade da lipase pancreática. Além disso, a ingestão dos HP ou da farinha de sardinela diminuiu também o ganho de peso e o peso relativo do tecido adiposo e reduziu o apetite. Os

HP exibiram igualmente um elevado efeito cardioprotetor contra o ataque cardíaco que foi demonstrado pela normalização dos índices de aterogénicos e pela conservação da estrutura histológica padrão do coração e da aorta. Assim, os autores concluíram que os HP de sardinela continham péptidos bioactivos que atenuavam a hiperlipidemia e podiam reduzir o risco de doença cardiovascular em ratos alimentados com rações de elevado valor calórico.

Num estudo recente, Mizushige *et al.* (2017) prepararam HP de escamudo do Alasca com pepsina e pancreatina e testaram os HP em ratos Sprague-Dawley. Verificaram que a ingestão destes HP reduziam a gordura corporal e aumentavam a massa muscular. Além disso, registaram igualmente no grupo dos ratos que consumiram os HP, uma diminuição do consumo de alimentos e das expressões do mRNA dos neuropéptidos Y e *agouti-related peptide* no hipotálamo. Segundo estes autores, estes resultados sugeriam que os efeitos antiobesidade e hipertrofia do músculo dos HP de escamudo do Alasca poderiam ser induzidos por péptidos libertados pelos HP no tracto digestivo.

1.5.8. Atividade antidiabética

A diabetes afeta aproximadamente 415 milhões de pessoas em todo o mundo, estando previsto que, em 2040, este número atinja 642 milhões (IDF Atlas, 2015). A diabetes *mellitus* tipo 2 é um distúrbio metabólico progressivo crónico, caracterizado por hiperglicemia devido à secreção deficiente de insulina e resistência à insulina. Nos estágios iniciais da diabetes, a secreção elevada de insulina pancreática pode compensar a resistência à insulina, evitando assim a hiperglicemia (Harnedy *et al.*, 2018). A resistência à insulina é caracterizada pela diminuição da receptividade da glucose pelas células do músculo, fígado e tecido adiposo, levando a que não seja utilizada e, por consequência, ao aumento do seu teor no sangue (hiperglicemia), quando a produção de insulina pancreática se torna insuficiente (Goldstein, 2002).

Existe atualmente um grande número de fármacos disponíveis no mercado para combater esta doença. Porém, regista-se igualmente uma crescente preocupação na procura de produtos naturais que limitam os efeitos secundários destes fármacos e com preços mais baixos.

Promintzer *et al.* (2006) e Oseguera-Toledo *et al.* (2014) mostraram que os níveis de glucose no sangue podem ser regulados por proteínas, HP, péptidos e aminoácidos através de mecanismos directos e/ou indirectos.

Wang *et al.* (2015) avaliaram a capacidade dos HP de gelatina de pele de pescada do Pacífico (*Merluccius productus*), alabote (*Hippoglossus stenolepis*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e peixe-leite (*Chanos chanos*) como inibidores da dipeptidil

peptidase IV (DPP-IV) e estimulantes do péptido-1 em ratos diabéticos e compararam também os HP preparados a partir dos peixes de água quente com os de água fria. A atividade inibidora da DPP-IV dos HP da gelatina dos peixes de água quente era superior à dos peixes de água fria e as frações de ultrafiltração com massas moleculares inferiores a 1,5 kDa obtidas a partir dos HP de alabote e de tilápia apresentavam atividade inibidora da DPP-IV *in vitro* de 38,2 e 51,9 %, respetivamente, para a concentração de 1 mg /mL. Estes HP foram ensaiados em ratos diabéticos, tendo sido verificado que os HP de tilápia eram mais eficientes do que os de alabote para melhorarem a tolerância dos ratos à glucose.

Também Harnedy *et al.* (2018) estudaram a atividade antidiabética de HP preparados a partir de aparas e de gelatina da pele de salmão do Atlântico (*Salmo salar*). Estes autores verificaram que os HP da gelatina e das aparas preparados conjuntamente com Alcalase 2.4 L e Flavourzyme 5000 L exibiam maior atividade inibidora da DPP-IV e secretora de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) do que os obtidos com Alcalase 2.4 L ou Promod 144 MG para a concentração de 2,5 mg/mL. Por outro lado, verificaram igualmente que os HP obtidos das aparas eram resistentes à digestão *in vitro* relativamente à atividade inibidora da DPP-IV e secretora do GLP-1 e da insulina. Em contrapartida, os HP de gelatina apresentavam menor atividade secretora de GLP-1 após digestão. Foram também identificadas as vias metabólicas específicas seguidas por cada um dos HP na mediação da respetiva atividade insulínica.

Na tabela 5, encontram-se outros exemplos da purificação de péptidos com várias atividades.

1.5.9. Outras atividades biológicas

Muitos problemas patológicos, incluindo defeitos de crescimento, hipogonadismo e disfunções neurológicas, são considerados associados à deficiência de zinco (Maret *et al.*, 2007). Os péptidos quelantes podem ser uma melhor alternativa para aumentar a absorção e biodisponibilidade dos minerais (Cross *et al.*, 2007; Miquel *et al.*, 2007) em comparação com os sais metálicos que apresentam algumas limitações, como baixa biodisponibilidade, reações oxidativas e efeitos colaterais na qualidade alimentar (Torres-Fuentes *et al.*, 2011). Além de facilitar a biodisponibilidade mineral, foi também observada a atividade antimicrobiana dos complexos péptido-metal (Grogan *et al.*, 2001).

Tabela 5 - Péptidos identificados com atividade antimicrobiana, antiproliferativa, antidiabética e anti inflamatória.

Biotividade	Espécie	Origem	Enzima(s)	Sequência(s) purificada(s)	Referência
Antimicrobiana (Estirpes microbianas) Gram-positiva (<i>Listeria innocua</i>) Gram-negativa (<i>Escherichia coli</i>)	Sarda (<i>Scomber scombrus</i>)	Vísceras, glândula digestiva, gônadas do estômago, coração, intestinos, fígado e baço	Protamex	SIFIQRFTT RKSGDPLGR AKPGDGAGSGPR GLPGPLGPAGPK	Ennaas et al. (2015)
Antimicrobiana (Estirpes microbianas) Gram-positiva (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. pneumoniae</i>), Gram-negativa (<i>E. coli</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>)	Biqueirão-do-Indo-Pacífico (<i>Engraulis japonicus</i>)	Água de cozedura	Protamex	GLSRLFTALK	Tang et al. (2015)
Antiproliferativa	Tuna (<i>Thunnus tonggol</i>)	Músculo escuro	Papaína, Protease XXIII	LPHVLTPEAGAT PTAEGGVYMT	Hsu et al. (2011)
Antiproliferativa	Tuna (<i>Thunnus tonggol</i>)	Água de cozedura	Protease XXIII	KPEGMDPPLSEPEDR RDGAAGPK KLPLLLAKLLMSGKLL AEPCTGR	Hung et al. (2014)
Antidiabética	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Pele	Flavourzyme 1000 L	IPGDPGPPGPPG LPGERGRPGAPGP GPKGDRGLPGPPGRD GM	Wang et al. (2015)
Antidiabética	Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	Subprodutos (carcaça)	Alcalase, bromelina, Flavourzyme	GPAE GPGA	Li-Chan et al. (2012)
Anti inflamatória	Salmão (espécie não identificada)	Barbatanas peitorais	Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsina, tripsina	Fração com massa molecular entre 1000 Da e 2000 Da	Ahn et al. (2012)
Anti inflamatória	Amêijoia-japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	-	Flavourzyme, neutrase, Protamex, Alcalase, papaína, pepsina, tripsina, α -quimotripsina	QCQQAVQSAV	Lee et al. (2012)
Anti inflamatória (células RAW 264.7 estimuladas por LPS)	<i>Mytilus coruscus</i>	-	Flavourzyme, neutrase, Protamex, Alcalase, papaína, pepsina, tripsina, α -quimotripsina	GVSLQQLFL	Kim et al. (2013)

Chen et al. (2013) procederam à purificação e caracterização de um complexo péptido-Zn. Este péptido (HLRQEEKEEVTVGSLK) com 1882 Da foi purificado a partir

de um HP de ostra preparado com pepsina. Este péptido apresentava a maior capacidade de complexação do zinco (6,56 µg de zinco/mg de péptido).

Jiang *et al.* (2014) procederam à preparação e identificação de péptidos obtidos a partir de carpa-prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) com papaína, Alcalase, Flavourzyme e tripsina. A partir destes péptidos, prepararam complexos com o zinco que apresentavam atividades antimicrobianas contra *S. aureus* e *E. coli*. Os complexos de zinco preparados com os péptidos obtidos com Flavourzyme apresentavam a maior atividade antibacteriana. Os resultados mostraram que os péptidos mais ricos em aminoácidos ácidos se ligavam melhor aos íons de zinco e, consequentemente, apresentavam maior atividade antibacteriana.

Jung *et al.* (2006a) prepararam um HP das proteínas de espinhas de escamudo-do-Alasca (*Theragra chalcogramma*) com pepsina. A partir deste HP, os autores purificaram e identificaram um péptido (VLSGGTTMAMYTLV) que exibia uma elevada afinidade para o cálcio. Este péptido apresentava a mesma capacidade para solubilizar o íon cálcio que um fosfatídeo de caseína.

Num outro estudo, Jung *et al.* (2006b) isolaram péptidos de HP, obtidos de proteínas de espinhas de granadeiro-azul (*Macrurus novaezelandiae*), que apresentavam elevada afinidade para o íon cálcio. No fracionamento por ultrafiltração, estes autores isolaram uma fração com uma elevada proporção de fosfopéptidos que inibiam a formação de sais de cálcio insolúveis a pH neutro. Em estudos *in vivo* com ovariectomizados, verificou-se um aumento da retenção de cálcio nos ossos e uma redução nas fezes.

Guo *et al.* (2013) prepararam HP da pele de escamudo-do-Alasca com enzimas comerciais (Flavourzyme, tripsina). Destes HP isolaram e identificaram um tripéptido (SCH) com elevada atividade quelante do ferro.

1.6. Aplicações dos HP

Os HP apresentam atualmente um grande interesse por parte de várias indústrias como a cosmética, farmacêutica, alimentar (suplementos proteicos, produtos de panificação) e nutracêutica em virtude de exibirem, tal como referido anteriormente, um grande número de atividades biológicas.

Assim, as suas características nutricionais têm levado à sua utilização como meios de cultura bacterianos, tanto para a produção de biomassa como de metabolitos e na alimentação animal. Neste último caso destaca-se a sua aplicação em rações para aquacultura para alevins e juvenis e como substitutos do leite em animais jovens. (Batista *et al.*, 2006).

Regista-se igualmente a utilização dos HP de pescado em produtos destinados à alimentação humana devido não só ao seu valor nutricional e atividades biológicas, mas também às propriedades funcionais, em particular a elevada solubilidade a vários valores de pH. De entre estes produtos destacam-se os seguintes: injeção em filetes de peixe cru; produção de intensificadores de sabor de pescado; enriquecimento proteico de bebidas; preparação de caldos ou sopas; hambúrgueres (Kristinsson, 2007; Bernardi *et al.*, 2016); molhos e alimentos específicos para crianças, adolescentes e idosos (Veit *et al.* 2012).

Na tabela 6 são apresentados alguns exemplos de patentes e aplicações dos HP de pescado em diversas áreas como a indústria alimentar, aquacultura/alimentação animal, cosmética e biomédica.

Tabela 6 - Aplicações de HP de pescado baseadas em Justia Patentes.

Referência	Setor	Aplicações/Objetivos
Berge <i>et al.</i> US Patent 2007/ 8206739 https://patents.justia.com/patent/20070141083	Indústria alimentar (alimentos funcionais) e farmacêutica	Suplemento alimentar para redução do colesterol no plasma e triacilgliceróis no fígado.
Jaeger US Patent 1980/ 4210634	Aquacultura	Ração melhorada para peixes e crustáceos, aumentando a resistência a condições ambientais desfavoráveis e a infecções.
Nielsen US Patent 2002/0182290 A1	Indústria alimentar	Método de processamento de pescado através de tratamento térmico de espinhas isentas do músculo do peixe.
Bjarnason e Benediktsson US 2006/7070953	Indústria alimentar /Alimentação animal/ Cosmética	Hidrolisados proteicos preparados com proteases de bacalhau.
La Rochelle <i>et al.</i> US 2011/0039768 A1 https://patents.justia.com/patent/20110039768	Indústria Biomédica	Hidrolisados proteicos com moléculas com capacidade para saciar e regular a ingestão de alimentos em seres humanos e animais.
Courois, E., Drieu La Rochelle H. WO 2010/149778A1	Indústria Biomédica	Hidrolisados proteicos para utilização na inibição do ganho de peso e / ou perda de peso.
Durant <i>et al.</i> US 2005/0074423 A1	Indústria Cosmética	Cosméticos que contêm hidrolisados proteicos à base de ostra.
http://www.verdirimedi.it/	Indústria Alimentar e Dietética	Nutrisnell Adjuvante no controlo de peso, mobiliza a gordura para fins energéticos.
www.ovitaminpro.com	Indústria Alimentar e Dietética	Seacure Suplemento alimentar com base em hidrolisados proteicos de peixe magro que ajuda na digestão e equilíbrio hormonal.
www.metagenics.com	Indústria Alimentar e Dietética	Vasotensin® Suplemento à base de hidrolisados proteicos de peixe bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>) com atividade anti-hipertensiva.
www.dielen.fr	Indústria Alimentar e Dietética	Molval Suplemento constituído por óleo e péptidos marinhos, contribuindo para a função cardíaca e para combate do stress oxidativo.

1.7. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- (i) preparação de hidrolisados proteicos por via enzimática (Alcalase, Flavourzyme e Alcalase + Flavourzyme) a partir de subprodutos resultantes da filetagem de tilápia-do-Nilo, tendo em vista a valorização desta matéria-prima;
- (ii) avaliação da atividade inibidora da α -amilase dos hidrolisados preparados
- (iii) avaliação da atividade antioxidante recorrendo a diferentes metodologias (capacidade de captar os radicais DPPH e ABTS, poder redutor e atividades quelantes do cobre e do ferro).

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

A matéria-prima utilizada na preparação dos hidrolisados proteicos foram subprodutos resultantes da produção de filetes de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) com corte em “V” e provenientes de uma empresa do município de Toledo, Paraná, Brasil. O material foi moído e armazenado em embalagens próprias para alimentos a -18°C até à preparação dos hidrolisados.

Foram utilizados produtos comerciais de origem microbiana: Alcalase® 2.4 L FG (20,2 % de proteína), produzida por *Bacillus licheniformis* e constituída maioritariamente pela protease serínica subtilisina A EC (3.4.21.62) e Flavourzyme® 1000 L, em que a principal enzima é uma aminopeptidase produzida por *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas foram gentilmente cedidas pela empresa Novozymes Latin America Ltda. Ambas as proteases são de grau alimentar e foram produzidas por organismos não patogénicos.

Dos reagentes mais específicos usados na caracterização das atividades biológicas dos hidrolisados, destacam-se os seguintes:

- ABTS - Fluka
- Acarbose - Sigma
- Amido azure - Sigma
- α -Amilase 1151 U/mg proteína, 42 mg/mL – Sigma
- DPPH – Sigma
- Ferrozina – Sigma-Aldrich
- OPA – Sigma-Aldrich
- Violeta de pirocatecol – Acros Organics

Os restantes reagentes são de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos HP

Inicialmente, procedeu-se ao descongelamento de 800 g de matéria-prima e adicionou-se 4 L de água fria (4 °C), correspondendo a uma relação de 1:5. A homogeneização da suspensão foi efetuada com um homogeneizador Polytron (11000 rpm, 2 min). Esta fase é muito importante para permitir um acesso mais fácil das enzimas às proteínas. Posteriormente, procedeu-se ao aquecimento da suspensão em banho-maria até 50 °C e o pH ajustado foi 7,5.

Seguiu-se o processo de hidrólise, adicionando à suspensão 4 g de Alcalase ou 4 g de Flavourzyme (0,5 % de enzima em relação à massa de matéria-prima ou cerca de 27 mg de enzima/g de proteína) no caso em que se utilizou apenas uma enzima. Em ambos os casos, a hidrólise decorreu durante 2h, ajustando-se o pH a 7,5 com NaOH 2 M. Procedeu-se também a uma hidrólise sequencial, com a adição em primeiro lugar de 0,5 % de Alcalase durante 1h e, posteriormente, de 0,5 % de Flavourzyme, prosseguindo a hidrólise durante 1h. Também neste caso, o pH foi ajustado a 7,5. No final da hidrólise, procedeu-se à inativação da(s) enzima(s) por aquecimento a 90°C durante 20 min numa placa de aquecimento. A seguir, arrefeceu-se a suspensão até à temperatura ambiente e centrifugou-se (10000 x g, 20 min), em frascos de policarbonato de 250 mL, obtendo-se duas frações: a aquosa que continha o material hidrolisado e outra insolúvel. O sobrenadante foi recuperado e concentrado num evaporador rotativo. De seguida, procedeu-se à congelação do concentrado e posterior liofilização num liofilizador Heto Power Dry LL3000. O produto seco foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

Na figura 3 encontra-se esquematizado o processo de hidrólise que foi realizado:

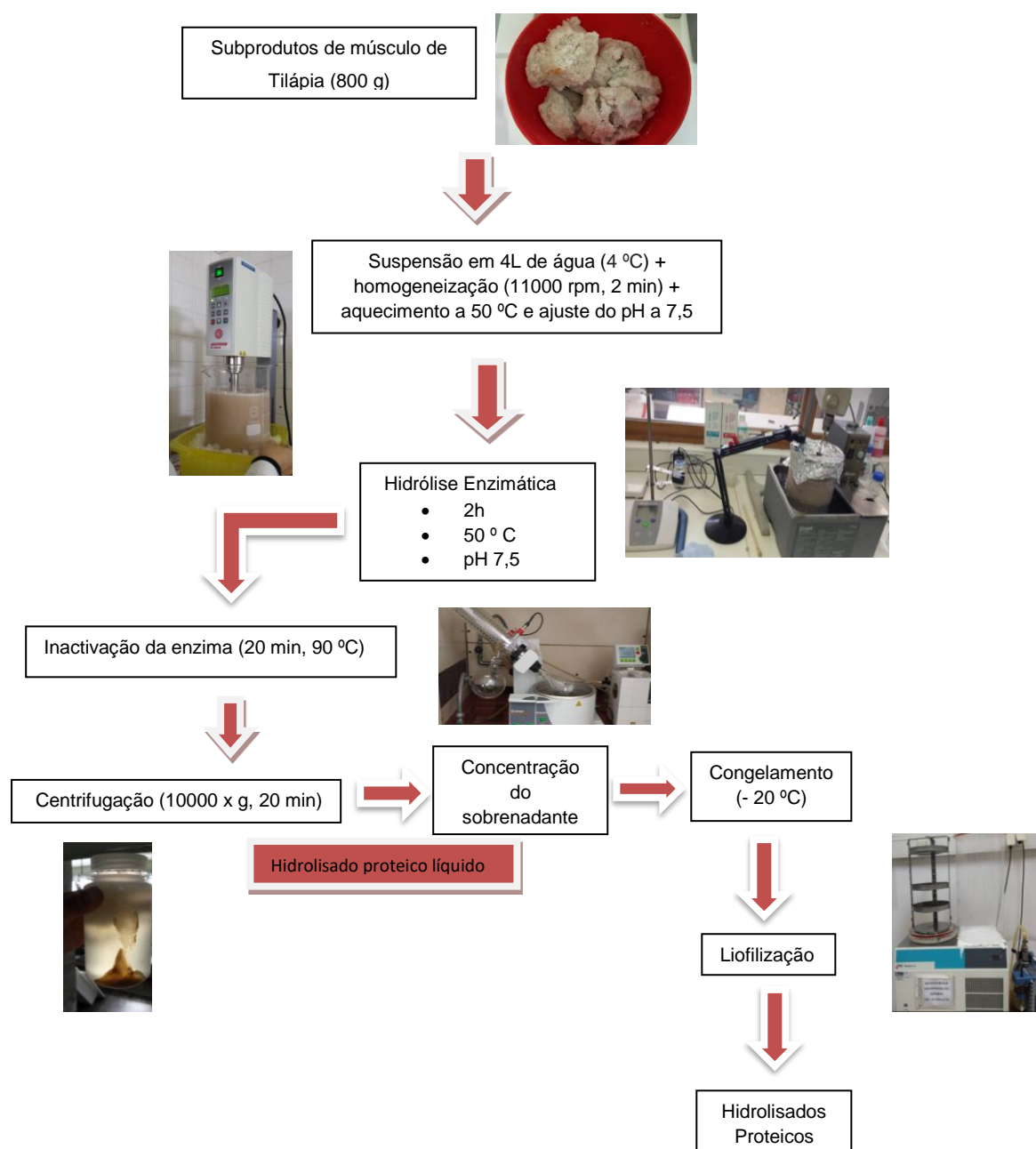


Figura 3 - Diagrama da produção de hidrolisados proteicos através de hidrólise enzimática.

2.2.2. Caracterização dos HP

2.2.2.1. Determinação do teor em azoto

O teor de azoto foi determinado num analisador LECO FP-528 (LECO, St. Joseph, EUA). Este doseamento baseia-se no método de Dumas e envolve a combustão da amostra entre 800-900 °C na presença de oxigénio, ocorrendo a destruição da matéria orgânica que é convertida em dióxido de carbono, água e óxidos de azoto. O dióxido de carbono e a água são eliminados e o azoto é doseado por um detetor de

condutividade térmica. O teor de proteína foi obtido multiplicando o teor de azoto por 6,25, fator usado no caso das proteínas de peixe.

O equipamento foi previamente calibrado com 50 e 100 mg de EDTA. As determinações foram realizadas em triplicado, tendo-se utilizado cerca de 200 mg de amostra (matéria-prima ou hidrolisado) em cada determinação.

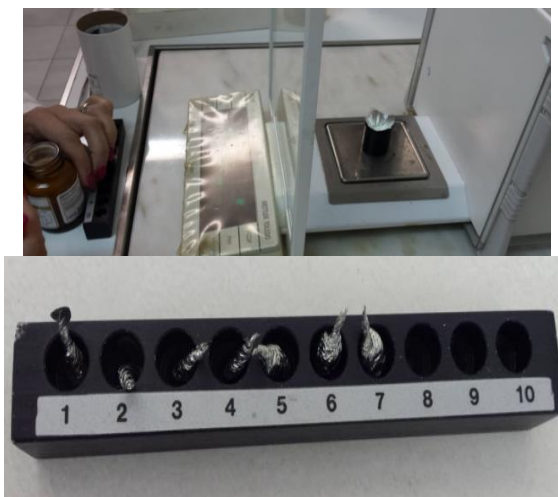


Figura 4 - Pesagem das amostras de EDTA para posterior determinação do teor de azoto.



Figura 5 - Diferentes constituintes do analisador LECO FP-528.

2.2.2.2. Determinação do GH

O GH é um parâmetro fundamental para a caracterização dos HP. O GH corresponde à relação percentual entre o número de ligações peptídicas que foram hidrolisadas e o número inicial de ligações.

O GH foi determinado usando o-ftaldialdído (OPA), seguindo o método descrito por Nielsen et al. (2001).

Pesou-se 7,620 g de tetraborato de disódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) e transferiu-se para um balão de 200 mL. Adicionou-se 200 mg de dodecilsulfato de sódio (SDS) dissolvido

em 150 mL de água. Posteriormente adicionou-se 160 mg de OPA dissolvidos em 4 mL de etanol puro. Adicionou-se 176 mg de DTT e fez-se o volume com 200 mL.

Para a preparação da solução de serina, juntou-se 50 mg de serina a 500 mL de água.

O ensaio decorreu à temperatura ambiente, tendo-se adicionado 400 µL da amostra a 3 mL da solução de OPA e misturado durante 5 segundos. Esperou-se 2 min, antes de se ter lido a absorvância a 340 nm.

O branco foi preparado nas mesmas condições à exceção da água destilada que foi usada em substituição da amostra, tendo o controlo com serina sido também realizado.

O reagente OPA foi preparado com a mistura de 7,620 g de deca-hidrato de tetraborato e 200 mg de SDS, que foram dissolvidos em 150 mL de água destilada. Posteriormente, 160 mg de OPA 97 % foram dissolvidos em 4 mL de etanol e adicionado à solução mencionada acima. Por fim, 176 mg de DTT 99 % foram adicionados e a solução foi feita com 200 mL com água destilada.

O critério utilizado para a utilização de hidrolisado foi que a concentração deste teria de estar entre 0,1 e 10 g, o que equivale a 80 % ou 8 % de proteína respectivamente, tendo sido utilizada a concentração de 40 mg/100mL de água.

O GH foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$GH (\%) = \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{(Abs_{serina} - Abs_{branco})} \times \frac{(0,9516 \times 10)}{(w \times N \times 6.25)} - 0,4 \right] \times \frac{100}{8,6}$$

em que Abs_{amostra} corresponde à absorvância do hidrolisado proteico, a 340 nm. Abs_{serina} à absorvância da serina, w o peso em gramas das amostras dos hidrolisados e N o total de nitrogénio (%) dos hidrolisados. As medições foram feitas em triplicado.

2.2.3. Atividades biológicas

2.2.3.1. Atividade inibidora da α-amilase

Na determinação da capacidade inibidora dos HP relativamente à α-amilase seguiu-se o método descrito por Hansawasdi *et al.* (2000) com algumas modificações, estando a equação química em questão, esquematizada na Figura 6.

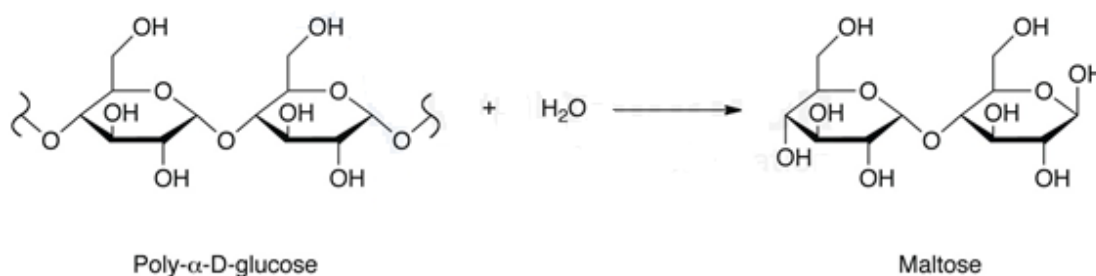


Figura 6 - Equação química relativa à inibição da α-amilase.

Preparou-se 500 mL de uma solução tampão de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,9 e 0,01 M de CaCl₂. Pesou-se 30,3 g de Tris e 0,555 g de CaCl₂ numa balança AT201, solubilizou-se num copo em cerca de 500 mL de água destilada e ajustou-se a pH 6,9 com HCl 0,1 M. Deitou-se esta solução num balão de 500 mL e ajustou-se até perfazer este volume.

Preparou-se 5 mL de uma solução de α-amilase de pâncreas de porco (PPA) no tampão Tris-HCl 0,5 M com uma concentração 0,05 U/ml a partir de uma solução com a concentração de 5 U/ml.

O substrato foi preparado solubilizando 500 mg de “starch azure” em 50 mL do tampão Tris-HCl 0,5 M. Posteriormente, ferveu-se a suspensão numa placa de aquecimento IKA C-MAG HS 7, durante 5 min com agitação até completa solubilização do “starch azure”.

Prepararam-se soluções dos hidrolisados em DMSO 0,1% com concentrações entre 2 e 200 mg/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se 100 µL da solução de α-amilase 0,05 U/ml e adicionou-se 200 µL de DMSO 0,1 % nos tubos de Eppendorf. Em paralelo, pipetou-se 100 µL do tampão Tris-HCl e 200 µL de DMSO 0,1 %. Pré incubou-se a 37 °C durante 20 min com agitação.
- 2 - Pipetou-se 100 µL da solução de α-amilase 0,05 U/ml e adicionou-se 200 µL das soluções dos hidrolisados nos tubos. Pré incubou-se a 37 °C durante 20 min com agitação.
- 3 - Adicionou-se a cada um dos tubos 200 µL de substrato e incubou-se, com agitação, a 37 °C durante 10 min.
- 4 - Após a incubação, adicionou-se 500 µL de ácido acético 50 % e centrifugou-se numa centrífuga 5804 R a 4 °C, 4500 rpm durante 5 min.
- 5 - Leu-se as absorvâncias no espectrofotómetro UNICAM UV – visível UV2a 595 nm.

6 - Em paralelo realizou-se um ensaio com uma solução de acarbose, um inibidor da α -amilase usado como fármaco antidiabético, com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (11,6 mg/100 mL).

Esquema do ensaio realizado:

Ensaio	α -amilase (μL)	Tampão (μL)	Hidrolisado (μL)	DMSO (μL)	Substrato (μL)	Ác. acético (μL)	Abs.
Act. α -amilase	100	-	-	200	200	500	A_c^+
Branco 1	-	100	-	200	200	500	A_c^-
Act. α -amilase+ HP	100	-	200	-	200	500	A_s
Branco 2	-	100	200	-	200	500	A_b

A atividade inibidora dos hidrolisados relativamente à α -amilase é calculada pela expressão:

$$\% \text{ de inibição da } \alpha - \text{amilase} = \frac{(A_c^+ - A_c^-) - (A_s - A_b)}{A_c^+ - A_c^-} \times 100$$

Em que:

A_c^+ – absorvância da solução do ensaio com α -amilase e sem HP

A_c^- – absorvância da solução do ensaio sem α -amilase e sem HP

A_s – absorvância da solução do ensaio com α -amilase e com HP

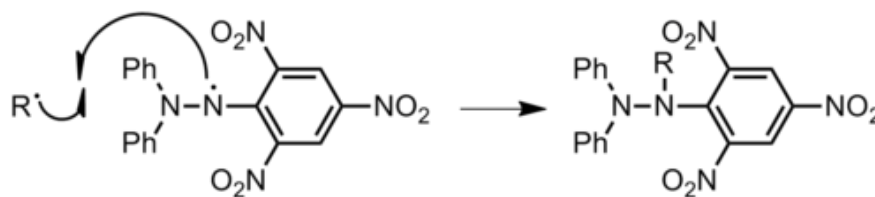
A_b – absorvância da solução do ensaio sem α -amilase e com HP

A partir dos valores da % de inibição da α -amilase vs concentração de HP, obteve-se o valor de IC_{50} .

2.2.3.2. Atividade Antiradicalar

2.2.3.2.1. Eliminação do radical DPPH•

A capacidade dos hidrolisados para eliminar radical DPPH• foi determinada de acordo com o método de Shimada *et al.* (1992) e tendo em consideração alterações referidas por Picot *et al.* (2010). A equação química referente a esta atividade encontra-se esquematizada na Figura 7.



R• representa o hidrolisado, Ph -fenilo

Figura 7 – Equação química referente à capacidade de eliminação do radical DPPH•.

Preparou-se de 500 mL de uma solução de DPPH 0,1 mM. Assim, pesou-se num copo 19,7 mg de DPPH e solubilizou-se num volume de etanol a 96 %. A seguir, deitou-se num balão volumétrico de 500 mL e perpez-se o volume até à marca. Prepararam-se soluções dos hidrolisados em água destilada com concentrações entre 0,5 e 5 mg/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se 1 mL de cada solução de hidrolisado e 1 mL da solução de DPPH. No ensaio em branco substituiu-se a solução do hidrolisado por água destilada.
- 2 - Agitou-se os tubos num banho durante 1h a 24°C com agitação ao abrigo da luz.
- 3 - Centrifugaram-se as amostras numa centrífuga 5804 R a 1000 x g durante 10 min.
- 4 - Leram-se as absorvâncias no espectrofotómetro a 517 nm, colocando na célula de referência 1 mL de etanol e 1 mL de água destilada.

A capacidade de eliminar o radical DPPH • foi calculada pela seguinte expressão:

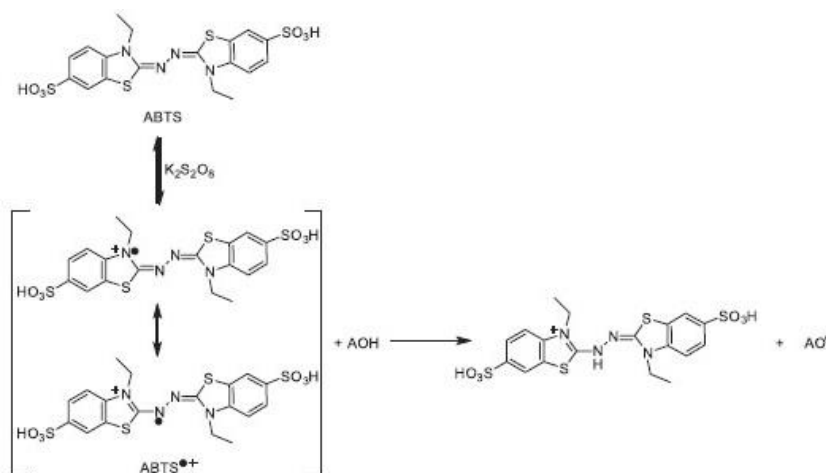
$$\text{Atividade antiradicalar (\%)} = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$$

sendo A_{controlo} a absorvância da solução de DPPH sem a amostra e A_{amostra} a absorvância da solução após a reacção com o hidrolisado.

A concentração de hidrolisado que exhibe 50 % de inibição (EC_{50}) foi estimada a partir da percentagem de inibição vs gráfico de concentração do hidrolisado.

2.2.3.2.2. Eliminação do radical ABTS••

Na determinação da atividade antiradicalar do ABTS•• seguiu-se o método descrito por Re *et al.* (1999) com algumas modificações.



AOH – composto antiradicalar

Figura 8 - Equação química relativa à capacidade de eliminação do radical $ABTS^{\bullet+}$.

Preparou-se 50 mL de uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM, pesando 33,1 mg e solubilizando neste volume de água.

Preparou-se 200 mL de uma solução tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, pesando 1,34 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ num balão de 500 mL e 0,69 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ noutro balão de 500 mL. Juntou-se 19 mL da solução de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ a 81 mL $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ juntamente com 75 mL de água destilada e acertou-se o pH a 7,4. Agitou-se a solução e colocou-se num balão de 200 mL, perfazendo com água destilada, com uma agitação posterior.

Preparou-se uma solução de ABTS, pesando 10 mg de ABTS e adicionando 2,6 mL de uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM, de modo a obter-se uma concentração final de 7 mM de $ABTS^{\bullet+}$. A solução permaneceu durante 16 horas no escuro à temperatura ambiente antes de ser utilizada. A solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída com o tampão fosfato de sódio de forma a obter-se um valor de absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm.

Prepararam-se diferentes soluções dos hidrolisados com concentrações entre 0,5 e 15 mg/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se para tubos de Eppendorf 20 μ L das soluções de hidrolisado com as diferentes concentrações e 20 μ L de água destilada no ensaio em branco.
- 2 - Pipetou-se 2 mL da solução de $ABTS^+$ para cada tubo de Eppendorf e agitou-se.
- 3 - Incubaram-se as amostras num banho a 30 °C durante 6 min no escuro.
- 4 - Leu-se o valor das absorvâncias a 734 nm num espectrofotómetro UNICAM UV – visível UV2.

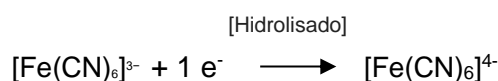
A percentagem de eliminação do radical ABTS^{•+} foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{branco}}} \times 100$$

em que Abs_{branco} corresponde à absorvância da amostra tomada como controlo e Abs_{amostra} corresponde à absorvância dos hidrolisados proteicos.

2.2.3.3. Poder redutor

O poder redutor dos hidrolisados foi determinado de acordo com o método de Oyaizu, 1988.



Preparou-se 500 mL de uma solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M com pH 6,6, tendo-se pesado 8,69 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5,261 g de Na_2HPO_4 num copo e solubilizou-se com água destilada. Deitou-se esta solução num balão de 500 mL e perpez-se o volume com água destilada.

Preparou-se 100 mL de uma solução de ferricianeto de potássio a 1%, 500 mL de uma solução de ácido tricloroacético a 10 % e 100 mL de uma solução de cloreto férrico 0,1 %.

Prepararam-se soluções dos hidrolisados com concentrações entre 0,5 e 15 mg/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se 2 mL de cada solução de hidrolisado e 2 mL de água no caso do ensaio em branco.
 - 2 - Adicionou-se 2 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,6.
 - 3 - Adicionou-se 2 mL de ferricianeto de potássio a 1 %.
 - 4 - Incubaram-se as soluções a 50 °C durante 20 min.
 - 5 - Adicionou-se 2 mL de TCA a 10 % de forma a parar a reação.
 - 6 - Centrifugaram-se os tubos numa centrífuga 5804 R a 1500 x g durante 10 min.
 - 7 - Retirou-se 2 mL de sobrenadante de cada tubo.
 - 8 - Adicionou-se 2 mL de água e 400 µL de cloreto férrico a 0,1%.
 - 9 - Incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min.
 - 10 - Leu-se a absorvância no espectrofotómetro UNICAM UV – visível UV2 a 700 nm.
- Ao valor da absorvância de cada solução, subtraiu-se o valor no respectivo branco ($A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} = \Delta A$), representou-se graficamente ΔA em função da concentração de

hidrolisado e obteve-se o valor da concentração de hidrolisado correspondente a $\Delta A = 0,5$ que se designa por $AC_{0,5}$.

2.2.3.4. Atividade quelante

2.2.3.4.1. Quelação do cobre

A atividade quelante do cobre pelos HP foi avaliada usando violeta de pirocatecol (PV) como indicador (Saiga, Tanabe e Nishimura, 2003) com algumas modificações tal como referidas no procedimento de Torres-Fuentes *et al.* (2011). Esta atividade encontra-se representada na Figura 9.

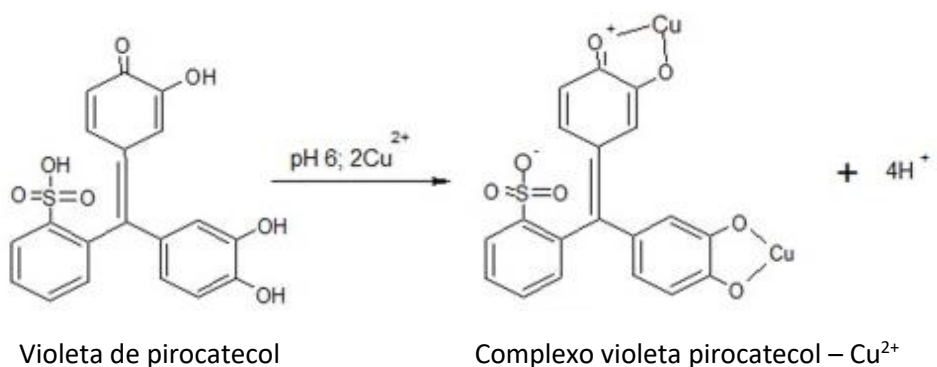


Figura 9 - Esquema representativo da atividade de quelação do cobre pelos HP.

Preparou-se 500 mL da solução tampão acetato de sódio 50 mM, tendo-se pesado 1,939 g de acetato de sódio e adicionado 77,9 μ L de ácido acético, de forma a se ter obtido uma solução de pH 6,0.

Preparou-se 200 mL de $CuSO_4$ 0,1mg/mL, tendo-se pesado 31,3 mg de sulfato de cobre pentahidratado.

Preparou-se 100 mL de violeta de pirocatecol 0,3 mM, pesando 58 mg deste corante e solubilizado em 50 mL de tampão, tendo-se obtido uma solução com uma concentração 3 mM. Desta solução pipetou-se 10 mL que se diluiu a 100 mL com solução tampão.

Prepararam-se soluções dos hidrolisados com concentrações entre 0,5 e 10 mg/mL e de EDTA com as concentrações de 50 μ g/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se, para tubos de Eppendorf, 1 mL de cada solução de hidrolisado e 1 mL de água destilada no caso do controlo positivo.
- 2 - Pipetou-se 1mL da solução de $CuSO_4$ e agitou-se.
- 3 - Pipetou-se 250 μ L de violeta pirocatecol e agitou-se novamente.

4 - Leu-se a absorvância a 626 nm no espectrofotômetro UNICAM UV – visível UV2 contra 1 mL de água e 1,25 mL de tampão.

A atividade quelante foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ Quelação do cobre} = \frac{Abs_{632nm}(PV + Cu^{2+}) - Abs_{632nm}(PV + Cu^{2+} + amostra)}{Abs_{632nm}(PV + Cu^{2+})} \times 100$$

em que $Abs_{632nm}(PV + Cu^{2+} + amostra)$ é a absorvância do complexo $PV + Cu^{2+}$ na presença das amostras dos hidrolisados e $Abs_{632nm}(PV + Cu^{2+})$ a absorvância do complexo $PV + Cu^{2+}$.

2.2.3.4.2. Quelação do ferro

A atividade de quelação do Fe^{2+} pelos hidrolisados foi determinada de acordo com o método de Decker e Welch (1990) e encontra-se representada na figura 10.

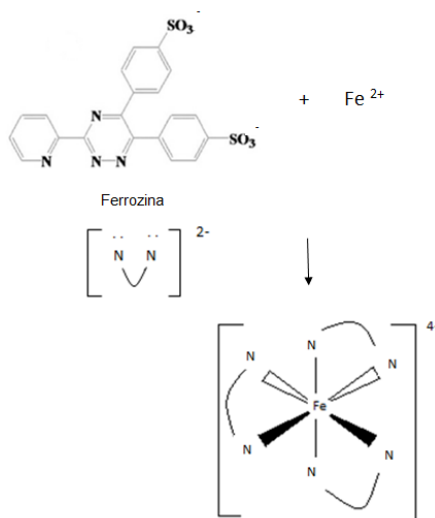


Figura 10 - Esquema representativo da atividade de quelação do Fe^{2+} por parte dos hidrolisados.

Preparou-se 25 mL da solução de ferrozina 5 mM, tendo-se pesado 49,5 mg e 25 mL da solução de $FeCl_2$ 2 mM (9,9 mg).

Preparam-se soluções dos hidrolisados com concentrações entre 2 e 25 mg/mL.

Procedimento:

- 1 - Pipetou-se, para tubos de Eppendorf, 1 mL de cada uma das soluções dos hidrolisados, 1 mL de água destilada no caso do controlo positivo e 1 mL da solução de EDTA com concentração de 50 µg/mL.
- 2 - Adicionou-se 3,7 mL de água destilada e 100 µL de FeCl₂ e agitou-se.
- 3 - Pipetou-se 200 µL de ferrozine e agitou-se novamente.
- 4 - Aguardou-se 10 min à temperatura ambiente.
- 5 - Leram-se os valores das absorvâncias no espetofotómetro UNICAM UV – visível UV2 a 562 nm.

A atividade de quelação do ferro foi calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Quelação do ferro} = \frac{Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controlo}}} \times 100$$

em que Abs_{controlo} é a absorvância do controlo positivo e Abs_{amostra} a absorvância das soluções com os hidrolisados proteicos.

2.2.4. Tratamento Estatístico

O programa Statistica 7 (American Statistical Association) foi usado para efectuar o tratamento estatístico. Os dados foram testados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para P<0,05.

3. Resultados e Discussão

3.1. Teor proteico dos HP

Na preparação dos HP ocorre a hidrólise enzimática das proteínas, levando à solubilização destes constituintes e à formação de duas frações: uma solúvel e outra insolúvel. A fração insolúvel era constituída, basicamente, por espinhas e proteínas não hidrolisadas. Na fração solúvel encontravam-se compostos hidrossolúveis que incluíam vários compostos azotados dos quais se destacam os péptidos resultantes da hidrólise e também uma pequena percentagem de lípidos, principalmente fosfolípidos. São os péptidos presentes nesta fração que determinam, fundamentalmente, as atividades biológicas destes produtos. Além destas frações, registava-se também a presença de uma pequena emulsão após a centrifugação. Esta emulsão era

constituída essencialmente por proteínas e gordura que se libertava devido à hidrólise das proteínas.

Os compostos azotados são o principal constituinte dos HP e, no caso dos HP obtidos neste trabalho, os teores de proteína, que não são significativamente diferentes, apresentam-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor proteico dos hidrolisados preparados com Alcalase (HP AI) Flavourzyme (HP FI) e Alcalase+Flavourzyme (HP AF).

Hidrolisado	Teor proteico (%)
HP AI	84,1±2,1 ^a
HP FI	86,1±2,0 ^a
HP AF	84,1±4,5 ^a

Os restantes constituintes, humidade, cinza e gordura, correspondem a cerca de 14 a 16 % do total. É plausível que a percentagem de gordura seja muito baixa porque a tilápia é um peixe magro e, além disso, ocorreu a libertação de alguma gordura durante o processo de preparação conforme já referido. Na cinza estão incluídos os sais minerais presentes no músculo do peixe que foram parcialmente solubilizados e os sais adicionados (hidróxido de sódio) durante a hidrólise para corrigir o pH. Por outro lado, a higroscopicidade dos HP pode contribuir também para diferenças no teor de humidade destes produtos.

Os teores de proteína dos HP preparados neste trabalho são semelhantes aos referidos por Foh *et al.* (2011) para os HP obtidos a partir do músculo cru ou cozido desta espécie com Alcalase. O teor proteico dos HP preparados a partir do músculo cru ou cozido era, respetivamente, 97,57 % e 85,40 %. Este menor teor de proteínas era devido à presença de mais cinza (8,89 %) neste último HP. Em contrapartida, os HP preparados por Silva *et al.* (2014) apresentavam teores de proteína relativamente baixos, variando entre 49,23 % e 58,48 % (base seca). Estes baixos teores eram devidos à elevada percentagem de lípidos nos HP, com teores entre 37,42 % e 44,51 % (base seca), que se deviam ao elevado teor lipídico (42,84 %, base seca) da matéria-prima (carcaça de tilápia) usada por estes autores. Também Roslan *et al.* (2014) referem a obtenção de um HP com um teor de proteína de 62,71 % o qual era devido ao elevado teor de cinza (25,34 %) do produto. Neste trabalho, o HP foi preparado num meio com tampão fosfato que contribuiu para o elevado teor de cinza registado.

Bernardi *et al.* (2016) seguiram a evolução do teor proteico dos HP durante a respetiva preparação a partir de carcaças e cabeças de tilápia e usando Alcalase. Durante o processo de preparação estes autores registaram uma gradual hidrólise das proteínas, levando a um aumento do teor de proteína dos HP de 76,20 %, após 40 min, até 80,01 % no final de seis horas de hidrólise. Por sua vez, Robert *et al.* (2015) e Srikanaya *et al.* (2017), trabalhando também com subprodutos de tilápia (carcaça, cabeças e vísceras), mas usando, respetivamente, Protamex e papaína obtiveram HP com teores de proteína de 80,2 % e 82,15 %, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho. Por último, o HP obtido por Wasswa *et al.* (2008) a partir de pele de tilápia tinha um teor proteico de 90,82 % e teores muito baixos de lípidos (0,19 %) e cinza (4,69 %).

3.2. Grau de hidrólise dos HP

O grau de hidrólise (GH) é um indicador do processo de hidrólise das proteínas, apresentando usualmente um aumento muito rápido no início da reação que diminui gradualmente até estabilizar (Hoyle e Merritt, 1994).

Na Tabela 8 apresentam-se os valores do GH dos HP obtidos no presente trabalho. Como se pode verificar, o HP FI apresentava o maior GH ($P < 0,05$) e o HP obtido com as duas proteases (HP AF) um valor intermédio. O GH do HP AF é mais próximo do valor atingido no HP FL, pelo que este valor se pode atribuir à acção da Flavourzyme que, na preparação deste HP, actuou durante uma hora. Se se admitir uma evolução linear do GH do HP AI, o valor atingido após uma hora de hidrólise com Alcalase seria cerca de 11,3 %. Como o GH do HP AF foi de 30,27 %, isso poderia significar que a subsequente actuação da Flavourzyme permitiu um aumento do GH de aproximadamente 19 %, valor superior a metade do valor atingido no HP FI. Deste modo, seria de admitir que a Flavourzyme teria hidrolisado muitos péptidos formados previamente pela ação da Alcalase em virtude de se tratar de uma aminopeptidase.

Atendendo a que o tamanho médio dos péptidos (PCL) é inversamente proporcional ao GH ($PCL \approx 100/DH$), é de admitir a seguinte ordem para o PCL dos três hidrolisados.

$$PCL_{HP\ FI} < PCL_{HP\ AF} < PCL_{HP\ AI}$$

A diferença dos PCL dos três HP bem como as respetivas sequências de aminoácidos vão determinar as atividades biológicas destes HP.

Tabela 8 - Grau de hidrólise dos hidrolisados preparados com Alcalase (HP AI) Flavourzyme (HP FI) e Alcalase+Flavourzyme (HP AF).

Hidrolisado	Grau de hidrólise (%)
HP AI	22,62 ± 0,39 ^c
HP FI	31,20 ± 0,60 ^a
HP AF	30,27 ± 1,42 ^b

Klompong *et al.* (2007) obtiveram as seguintes relações lineares entre o GH de hidrolisados de yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) e o logaritmo da concentração da enzima:

$$GH = 12,31 \log[E]_{\text{Alcalase}} + 30,805 \quad (A)$$

$$GH = 12,647 \log[E]_{\text{Flavourzyme}} + 12,476 \quad (B)$$

O GH foi determinado com um pH stat e os dados usados para estabelecer estas equações foram obtidos nas seguintes condições experimentais:

Alcalase – pH 8,5, T 60 °C e t 20 min

Flavourzyme – pH 7, T 50 °C e t 20 min

Com base nestas equações e tendo em consideração a concentração de 0,5 % das enzimas, obtiveram-se 27,1 % e 8,7 % para o GH dos hidrolisados preparados respetivamente com Alcalase e Flavourzyme. Embora as condições experimentais seguidas neste trabalho fossem diferentes das usadas para estabelecer aquelas equações, o valor obtido para o GH do primeiro hidrolisado é da ordem de grandeza do obtido neste trabalho. Porém, no caso do hidrolisado preparado com Flavourzyme o valor experimental afasta-se muito do calculado com a equação B.

O GH dos hidrolisados obtidos por diferentes autores a partir do músculo ou dos subprodutos de tilápia apresenta uma grande gama de variação. Esta variação está relacionada com as características da matéria-prima (crua ou cozida), condições de hidrólise (relação matéria-prima/solução, percentagem de enzima, tempo de hidrólise) e também com o método usado na determinação do GH (método colorimétrico, pH-stat¹, azoto solúvel). Assim, os HP preparados com Alcalase a partir do músculo de tilápia apresentavam um GH de 24,9 %, mas o GH dos HP obtidos com Flavourzyme era apenas de 2,5 % (Foh *et al.*, 2010). O GH dos HP AI é semelhante ao referido por

¹ Equipamento que permite manter constante automaticamente o pH durante a hidrólise adicionando ácido ou base. O volume de ácido ou base adicionado permite depois calcular o grau de hidrólise. Ao longo do tempo vão-se obter registos do ácido ou base consumidos.

estes autores, mas o dos HP FI é cerca de 12 vezes mais elevado do que o dos hidrolisados preparados por estes autores com Flavourzyme. Também Shamloo *et al.* (2012) obtiveram HP com GH de 17 % e 7,5 %, usando respetivamente Alcalase e Flavourzyme. Nestes trabalhos a diferença de GH dos HP obtidos com Alcalase ou Flavourzyme evidencia o efeito da enzima utilizada na preparação. Em ambos os trabalhos o tempo de hidrólise foi de duas horas e os autores recorreram ao pH-stat para determinar o GH.

Fan *et al.* (2012) obtiveram HP com um GH de 12,7 % após quatro horas de hidrólise com Flavourzyme, mas os HP preparados por Roslan *et al.* (2014) e por Bernardi *et al.* (2016) com Alcalase atingiram GH de 20,20 % e 23,35 %, respetivamente, após duas horas de hidrólise. Nestes trabalhos, os autores determinaram o GH por métodos colorimétricos.

Por outro lado, Daud *et al.* (2013, 2015) referem valores de GH de 63,49 % para HP preparados com Alcalase após duas horas de hidrólise. Este elevado valor do GH deve-se ao facto destes autores terem procedido à sua determinação a partir do azoto solúvel que sobrestima consideravelmente este valor. No entanto, o GH dos HP obtidos por Silva *et al.* (2014) com Alcalase era 27,5 %, embora estes autores tenham seguido o mesmo método de Daud *et al.* (2013, 2015) na determinação do GH. No trabalho de Wasswa *et al.* (2008) os HP da pele de tilápia preparados com Alcalase tinham um GH de 16 %, após 85 min de hidrólise, valor inferior ao atingido no HP AI.

Chen *et al.* (2015) verificaram que as proteínas miofibrilares do músculo de tilápia eram mais susceptíveis à hidrólise com papaína do que as sarcoplásmicas e as do estroma. Por sua vez, Srikanth *et al.* (2017), usando também papaína, obtiveram HP com 14,23 % de GH após uma hora de hidrólise. Por sua vez, Robert *et al.* (2015) obtiveram HP com 22,1 % de GH, usando Protamex (0,15 %) após 30 min de hidrólise.

Por último, Choonpicharn *et al.* (2015) avaliaram o efeito de várias enzimas no GH de hidrolisados de gelatina extraída da pele de tilápia. Assim, os HP obtidos com Flavourzyme tinham um GH de 56,61 % enquanto o dos HP preparados com Alcalase era 16,05 %. O tempo de hidrólise foi de 4 horas e a determinação do GH foi realizada por um método colorimétrico.

3.3. Atividade Antioxidante dos HP

3.3.1. Capacidade de inibição do DPPH[•]

O DPPH[•] é um radical estável com coloração violeta que apresenta um máximo de absorção a 515 nm. Na presença de compostos doadores de um átomo de hidrogénio, este radical é reduzido, levando à perda da cor violeta.

O efeito da concentração dos HP na percentagem de inibição do radical DPPH[•] apresenta-se na figura 11. O padrão da evolução da inibição deste radical é o usual, registando-se um aumento muito acentuado para as concentrações mais baixas dos HP, estabilizando a partir de determinado valor da concentração que depende do HP. A atividade antirradicalar é tanto mais elevada quanto mais acentuada for a inibição atingida para baixas concentrações de HP. Isto significa que quanto mais baixo for o valor de EC₅₀, maior é a capacidade inibidora do radical DPPH[•] pelos HP. Os valores de EC₅₀ respeitantes à inibição do DPPH[•] apresentam-se na Tabela 9.

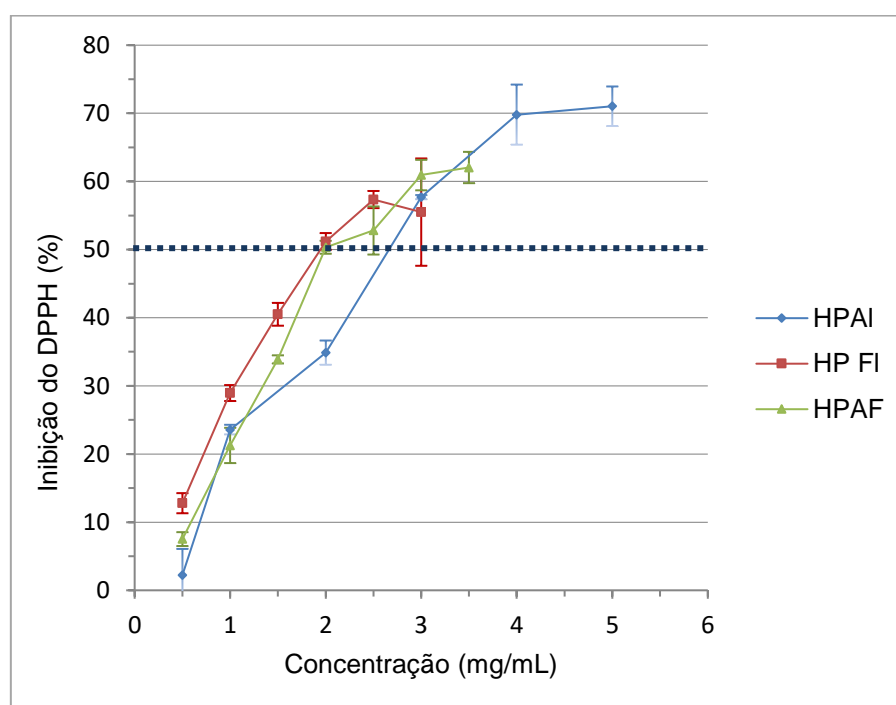


Figura 11 - Percentagem de inibição do radical DPPH[•] em função da concentração de HP AI, HP FL e HP AF.

Tabela 9 - Valores de EC₅₀ da inibição do DPPH[•] pelos HP.

Hidrolisado	EC ₅₀ (mg/mL)
HP AI	2,47 ± 0,01 ^b
HP FI	1,94 ± 0,05 ^a
HP AF	2,00 ± 0,02 ^a

O hidrolisado HP FI apresentava uma atividade inibidora do DPPH[•] significativamente mais elevada do que o HP AI, indicando que a Flavourzyme levou à formação de uma maior percentagem de péptidos exibindo maior atividade inibidora deste radical e com carácter mais hidrófobo. Por sua vez, a atividade inibidora do hidrolisado HP AF não era significativamente diferente da atividade do HP FI parecendo dever-se a um grande contributo dos péptidos resultantes da hidrólise com Flavourzyme dado que esta enzima atuou durante apenas uma hora.

A atividade antirradicalar destes hidrolisados é semelhante à obtida por Fan *et al.* (2012) na fração de péptidos com massas moleculares inferiores a 1 kDa, fração que apresentava o valor mais baixo de EC₅₀ (1,92 mg/mL). Esta fração de péptidos foi obtida a partir do fracionamento, com membranas de ultrafiltração, de hidrolisados de carcaça de tilápia preparados com Flavourzyme durante quatro horas.

Também Tejpal *et al.* (2017) obtiveram hidrolisados de subprodutos de tilápia que apresentavam valores de EC₅₀ entre 1,35 mg/mL e 2,07 mg/mL. Os hidrolisados preparados por estes autores foram preparados com pepsina, durante três horas e utilizando matéria-prima com diferentes graus de frescura (0, 1 e 2 dias de conservação em gelo). Os resultados obtidos por estes autores indicavam uma progressiva diminuição da atividade antioxidante dos péptidos obtidos com o período de conservação da tilápia.

Igualmente os hidrolisados de gelatina extraída da pele de tilápia exibiam um valor de EC₅₀ de 3,66 mg/mL (Zhang *et al.*, 2012). Estes hidrolisados foram preparados com uma mistura das enzimas prosperase E e multifacet neutral em diferentes condições de hidrólise.

Por outro lado, os hidrolisados preparados por Shamloo *et al.* (2012) a partir do músculo de tilápia apresentavam valores de EC₅₀ muito superiores aos obtidos no presente trabalho. Assim, Shamloo *et al.* (2012) indicavam valores de $18,72 \pm 2,5$ mg/mL e $74,91 \pm 3,2$ mg/mL para hidrolisados produzidos, respetivamente com Alcalase e Flavourzyme, durante duas horas.

No trabalho de Chen *et al.* (2015) avaliou-se a atividade inibidora do DPPH[•] dos hidrolisados preparados com papaína a partir de proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares e do estroma de tilápia. Os hidrolisados resultantes das proteínas sarcoplásmicas exibiam a maior atividade antirradicalar. Uma solução com a concentração de 3 mg/mL apresentava uma inibição do DPPH[•] de 84,61 %. Porém, os hidrolisados das proteínas miofibrilares e do estroma tinham atividades consideravelmente mais baixas com valores de 22,77 % e 22,56 %, respetivamente, para a mesma concentração de hidrolisado (3 mg/mL).

Em contrapartida, os hidrolisados preparados por Foh *et al.* (2010) apresentavam atividades antioxidantes relativamente elevadas. Os hidrolisados foram preparados a partir de músculo de tilápia, cru ou cozido, com Alcalase ou Flavourzyme. As percentagens de inibição dos hidrolisados preparados com o músculo, usando Alcalase ou Flavourzyme foram, respetivamente, 86,67 e 70,20 para concentrações dos hidrolisados de 5 mg/mL. Os hidrolisados preparados com estas enzimas, mas usando o músculo cozido exibiam atividades antirradicais um pouco mais baixas. Neste caso as percentagens de inibição, para a mesma concentração de hidrolisado, foram 84,67 e 64,67, respetivamente para os hidrolisados preparados por estes autores com Alcalase ou Flavourzyme.

3.3.2. Capacidade de inibição do ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} é solúvel em água e em solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Suwal *et al.*, 2018).

Na figura 12 apresenta-se o efeito da concentração dos HP na inibição do radical ABTS^{•+} com os hidrolisados produzidos neste ensaio. Verificou-se que a evolução da percentagem de inibição do ABTS^{•+} em função da concentração dos HP é semelhante à registada no caso do DPPH[•]. A fim de permitir uma melhor comparação dos resultados, define-se também o EC₅₀ cujos valores mais baixos correspondem a atividades antirradicais mais elevadas. Assim, na Tabela 10 apresentam-se os valores de EC₅₀ destes hidrolisados, verificando-se que os hidrolisados HP AI e HP FI não apresentavam diferenças significativas de atividade inibidora deste radical. Porém, o hidrolisado HP AF apresentava a atividade inibidora significativamente mais elevada. Contrariamente à atividade inibidora do DPPH[•], a acção conjunta das duas enzimas permitiu a obtenção de péptidos com maior atividade inibidora do ABTS^{•+}. Estes resultados sugerem que, de entre os novos péptidos formados pela Flavourzyme, havia uma percentagem elevada de péptidos hidrofílicos cuja atividade inibidora é avaliada no ensaio de determinação da atividade inibidora do ABTS^{•+}. Efetivamente, este ensaio realiza-se em meio aquoso, enquanto o ensaio de determinação da atividade inibidora do DPPH[•] decorre num meio hidrófobo.

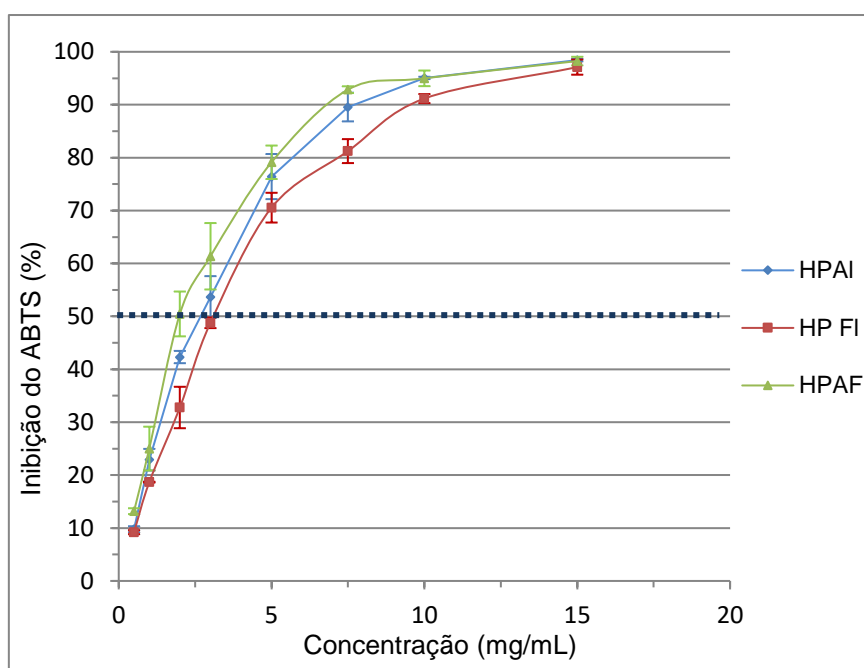


Figura 12 - Percentagem de inibição do radical ABTS^{•+} em função da concentração de HP AI, HP FL e HP AF.

Tabela 10 - Valores de EC₅₀ da inibição do ABTS^{•+} pelos HP.

Hidrolisado	EC ₅₀ (mg/mL)
HP AI	2,72 ± 0,20 ^b
HP FI	3,10 ± 0,07 ^b
HP AF	2,01 ± 0,15 ^a

Os hidrolisados preparados por Foh *et al.* (2010) apresentavam elevadas atividades inibidoras do ABTS^{•+}. Assim, os hidrolisados preparados por estes autores com músculo cru de tilápia, usando Alcalase ou Flavourzyme, exibiam percentagens de inibição deste radical de 91,27 % e 88,13 %, respetivamente, para uma concentração de HP de 66,67 µg/mL. Por outro lado, a atividade inibidora dos HP preparados a partir do músculo cozido era um pouco mais elevada, atingindo 92,60 % e 93,50 %, respetivamente, nos hidrolisados preparados com Alcalase ou Flavourzyme, para a mesma concentração de hidrolisado.

Também os HP de ovos de carpa-comum (*Cyprinus carpio*) obtidos com Alcalase (Chalamaiah *et al.*, 2015) apresentavam uma maior atividade inibidora do ABTS^{•+} (EC₅₀ = 0,301 mg/mL) do que os HP de tilápia. Os valores de EC₅₀, obtidos por Najafian e Babji (2015), dos HP das proteínas miofibrilares de panga (*Pangasius sutchi*), com Alcalase e Flavourzyme, eram 0,893 ± 0,31 mg/mL e 1,490 ± 0,23 mg/mL,

respetivamente, indicando uma maior atividade inibidora deste radical do que os hidrolisados de tilápia. Igualmente Chai *et al.* (2015) referem a obtenção de hidrolisados de raia (*Dasyatis kuhlii*) com Alcalase que exibiam maior atividade inibidora do ABTS^{•+} ($EC_{50} = 793,9 \pm 16,6 \mu\text{g/mL}$). Bkhairia *et al.* (2016) avaliaram a capacidade inibidora de HP do músculo de tainha-garrento (*Liza aurata*), obtidos com diferentes proteases, relativamente ao radical ABTS^{•+}. Os valores de EC_{50} variavam entre 0,47 mg/mL no caso do hidrolisado preparado com a protease de *Pseudomonas aeruginosa* A26 e 0,81 mg/mL para o hidrolisado preparado com um extrato de proteases alcalinas das vísceras de tainha-garrento.

3.3.3. Poder Redutor

A determinação do poder redutor é usada para avaliar a capacidade de um antioxidante para fornecer eletrões ou átomos de hidrogénio, um mecanismo que pode estabilizar os radicais livres (Sampath Kumar *et al.*, 2012). Deste modo, o poder redutor de um composto pode constituir um bom indicador do seu potencial como antioxidante (Meir *et al.*, 1995).

Na figura 13 apresenta-se o poder redutor dos HP em função da concentração. Na gama de concentrações ensaiada (0 a 15 mg/mL) registou-se uma variação linear do poder redutor com a concentração de hidrolisado. Este tipo de evolução é frequentemente obtido na determinação do poder redutor dos HP. De modo a permitir uma mais fácil comparação dos resultados, considerou-se a concentração de hidrolisado que permite atingir um valor de $A = 0,5$ (designou-se por $AC_{0,5}$), tal como referido por Amza *et al.* (2013). Os valores de $AC_{0,5}$ dos HP preparados encontram-se na Tabela 11, verificando-se que eram significativamente diferentes, com a seguinte ordem crescente do poder redutor:

$$\text{HP AF} < \text{HP AI} < \text{HP FI}$$

O menor poder redutor do HP AF sugere que a adição de Flavourzyme não contribuiu para a formação de novos péptidos exibindo esta atividade, contrariamente ao verificado nos péptidos com atividades inibidoras do ABTS^{•+} e DPPH[•].

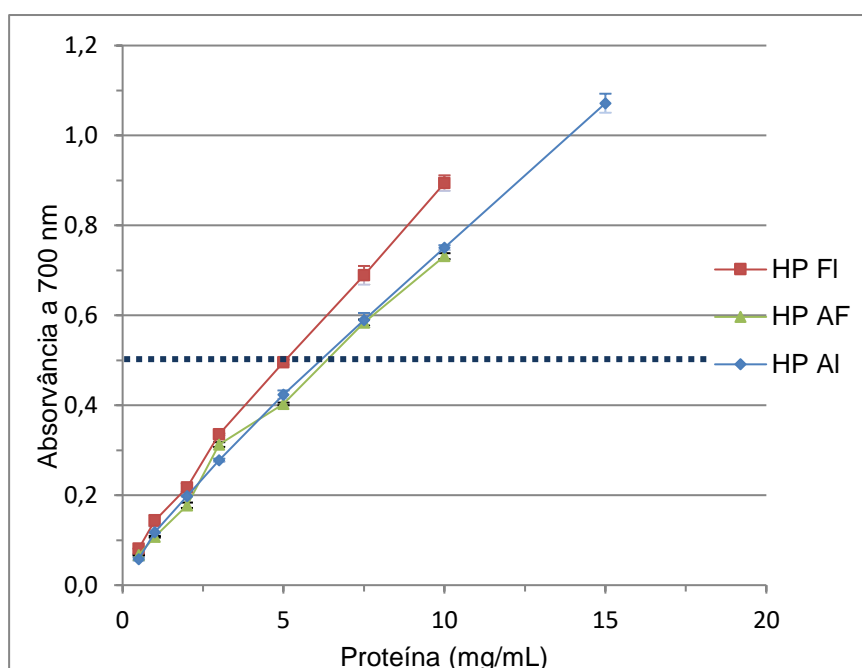


Figura 13 - Poder redutor dos hidrolisados proteicos HP AI, HP FI e HP AF em função da concentração.

Tabela 11 - Valores de $AC_{0,5}$ respeitantes ao poder redutor dos HP.

Hidrolisado	$AC_{0,5}$ (mg/mL)
HP AI	$6,46 \pm 0,08^b$
HP FI	$4,78 \pm 0,11^c$
HP AF	$6,68 \pm 0,07^a$

A determinação do poder redutor de hidrolisados proteicos de origem vegetal ou animal tem sido referida em grande número de trabalhos e seguindo a técnica descrita por Oyaizu *et al.* (1988). Porém, a fim de comparar os resultados obtidos neste estudo com os de outros já publicados, selecionaram-se apenas os trabalhos em que foram utilizados os mesmos volumes dos reagentes e condições do ensaio. Assim, Theodore *et al.* (2008) obtiveram valores de 0,2 para o poder redutor de soluções (1,5 mg/mL) de hidrolisados preparados a partir de peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) com Protamex. Este valor é da ordem de grandeza dos resultados obtidos nos HP do presente trabalho e com a mesma concentração.

No trabalho de Je *et al.* (2009) avaliou-se o poder redutor de HP preparados a partir do fígado de atum (*Katsuwonus pelamis*), usando também Alcalase (AH), Flavourzyme (FH) e Alcalase + Flavourzyme (AFH). Os valores indicados por estes autores, para

concentrações dos HP de 2 mg/mL, foram 0,37 para AH, 0,28 para FH e 0,42 para AFH. Estes valores são semelhantes aos obtidos neste trabalho para esta concentração dos HP os quais foram 0,195 (HP AI), 0,227 (HP FI) e 0,191 (HP AF). Por sua vez, o poder redutor dos HP de ovas de carpa-comum ($AC_{0,5} \approx 2$ mg/mL) era muito superior ao dos HP do presente trabalho (Chalamaiah *et al.*, 2015).

No estudo de Chen *et al.* (2015) verificou-se que os hidrolisados das proteínas sarcoplásmicas de tilápia preparados com papaína apresentavam o poder redutor mais elevado ($0,629 \pm 0,022$), seguido dos hidrolisados das proteínas miofibrilares ($0,169 \pm 0,013$) e dos hidrolisados das proteínas do estroma ($0,086 \pm 0,007$). Estes valores foram obtidos com a concentração de 3 mg/mL. Para esta concentração, os valores obtidos para os HP deste trabalho foram: 0,264 (HP AI), 0,311 (HP FI) e 0,260 (HP AF).

3.3.4. Capacidade de quelante do ferro (Fe^{2+})

Os metais de transição, tais como o ferro, cobre e cobalto, reagem com os peróxidos fornecendo elétrons e levando à formação de radicais alcoxi. Assim, a quelação dos íons destes metais retarda os processos de oxidação. O íon ferroso, em particular, desempenha um papel fundamental na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células, levando a um aumento dos níveis de peroxidação dos lípidos.

Na figura 14 encontra-se a evolução da capacidade quelante dos HP em função da respetiva concentração e, com base nestes resultados, calculou-se os valores de EC_{50} dos HP que se apresentam na Tabela 12. Estes valores evidenciam a menor capacidade quelante dos HP AI. Por outro lado, as capacidades quelantes dos HP FI e HP AF não eram significativamente diferentes. A diferença de capacidade quelante entre os HP AI e HP FI pode estar relacionada com o tamanho médio dos péptidos que eram, respetivamente, 4,4 e 3,2.

Intarasirisawat *et al.* (2012) mostraram que a capacidade quelante do Fe^{2+} de HP de ovas de atum aumentava com o GH. Segundo estes autores, o impedimento estereoquímico dos péptidos com maior tamanho médio poderia diminuir a capacidade para migrarem e quelarem o íon metálico alvo. Esta diferença pode também ser devida à composição peptídica destes HP a qual, por sua vez, resulta da especificidade das enzimas utilizadas.

Efetivamente, a capacidade quelante dos péptidos depende do tamanho, dos aminoácidos que os constituem e da respetiva sequência em que se encontram nos péptidos. Por exemplo, os péptidos com histidina apresentam uma forte capacidade quelante dos íons metálicos devido à presença do anel imidazol (Chalamaiah *et al.*,

2012). Para comparação, determinou-se nas mesmas condições do ensaio, a capacidade quelante do Fe^{2+} pelo EDTA, tendo-se obtido um valor de 65,7 % para uma concentração de EDTA de 1 mg/mL. Por outro lado, Teixeira *et al.* (2016) obtiveram um valor de $\text{EC}_{50} = 12,2 \pm 1,5$ mg/mL para a capacidade quelante de um HP comercial preparado a partir de bacalhau. Este valor é da ordem de grandeza do obtido neste trabalho para o hidrolisado HP AI.

Figura 14 - Capacidade quelante do Fe^{2+} pelos hidrolisados em função das respectivas concentrações (A). Valores de EC_{50} em função do tamanho médio dos péptidos dos HP (B).

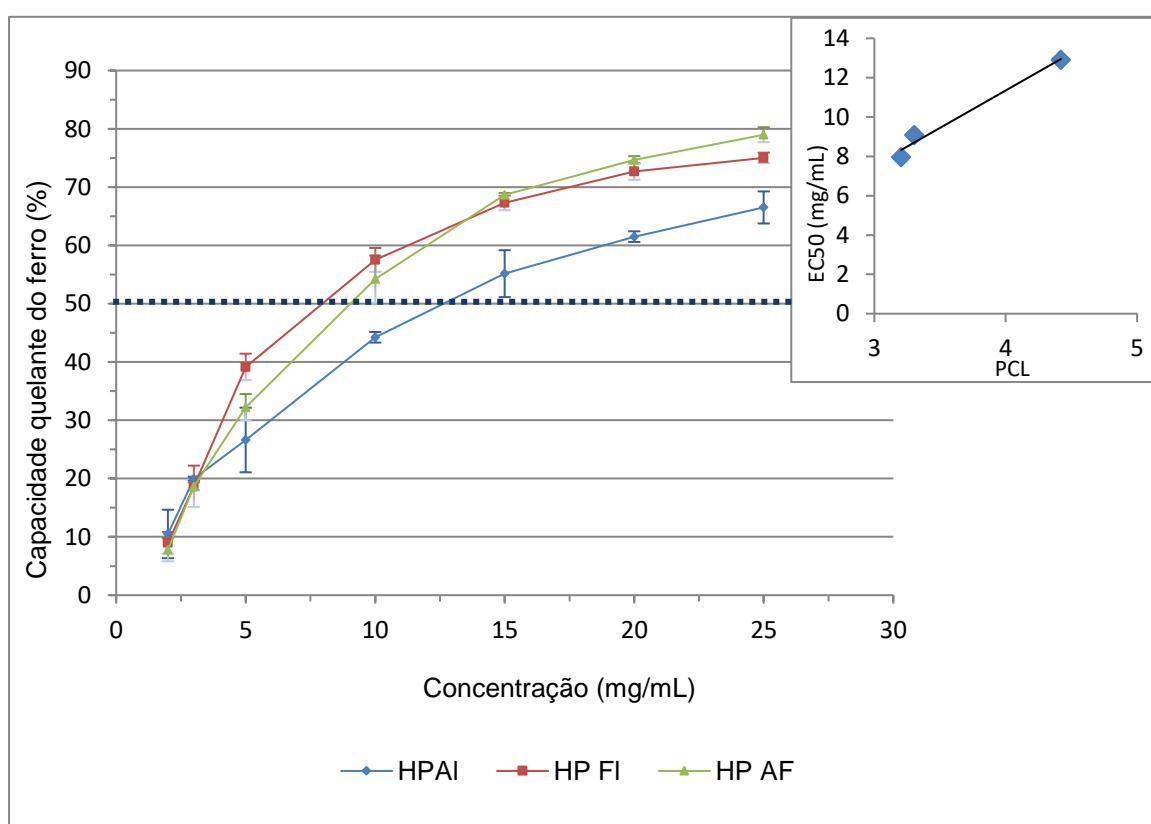


Tabela 12 - Valores de EC_{50} da capacidade quelante do Fe^{2+} pelos HP.

Hidrolisado	EC_{50} (mg/mL)
HP AI	$12,92 \pm 1,0^a$
HP FI	$7,97 \pm 0,26^b$
HP AF	$9,09 \pm 0,71^b$

Os HP das proteínas miofibrilares de panga, preparados com Alcalase e Flavourzyme, apresentavam, respetivamente, valores de EC_{50} de $42,98 \pm 0,37$ mg/mL

e $65,39 \pm 0,24$ mg/mL (Najafian e Babji, 2015). A capacidade quelante do Fe^{2+} dos hidrolisados preparados por Foh *et al.* (2010) era muito superior à dos HP obtidos neste trabalho. Assim, estes autores obtiveram percentagens de quelação de 82,57 e 75,80, respetivamente para os HP preparados com Alcalase e Flavourzyme a partir do músculo cru de tilápia e com uma concentração de hidrolisado de 5 mg/mL. Os HP preparados com o músculo cozido apresentavam uma capacidade quelante semelhante, sendo de 78,00 % e 75,00 %, respetivamente para os HP obtidos com Alcalase e Flavourzyme.

Também os HP obtidos por Sampath Kumar *et al.* (2012) exibiam elevadas percentagens de quelação deste ião, indicando valores de 52,3 % e 57,2 %, respetivamente para os hidrolisados da pele de peixes das espécies *Magalaspis cordyla* e *Otolithes ruber*. Igualmente Naqash e Nazeer (2013), Chalamaiah *et al.* (2015) e Teixeira *et al.* (2016) referem valores baixos de EC_{50} . Assim, os primeiros autores, usando peixes da espécie *Nemipterus japonicus*, obtiveram valores de aproximadamente 0,5 mg/mL para os HP obtidos com pepsina ou tripsina e 1 mg/mL para o HP obtido com papaína. Os HP preparados por Chalamaiah *et al.* (2015) com Alcalase tinham um valor de 0,948 mg/mL e os de Teixeira *et al.* (2016), preparados com subprodutos de pescada-do-Cabo (*Merluccius capensis*) e obtidos com Protamex tinham um valor de $1,3 \pm 0,5$ mg/mL.

Por último, há a referir os trabalhos de Je *et al.* (2009) e García-Moreno *et al.* (2014) que usaram duas enzimas na preparação dos HP. Os primeiros autores referem percentagens de quelação de 55, 64 e 63 para uma concentração de 2,5 mg/mL, respetivamente para os HP obtidos com Alcalase, Flavourzyme e Alcalase+Flavourzyme. Estes autores verificaram também que os HP obtidos com as duas enzimas apresentavam menor capacidade quelante do que os preparados com as enzimas isoladamente. García-Moreno *et al.* (2014) utilizaram Alcalase e tripsina em sequência ou misturadas, na hidrólise de várias espécies de pescado (besugo, boga, carapau, pata-roxa e sardinha), tendo HP com valores de EC_{50} entre 0,32 e 0,63 mg/mL, apresentando os HP de sardinha e de pata-roxa as maiores capacidades quelantes do Fe^{2+} .

3.3.5. Capacidade de quelante do cobre (Cu^{2+})

Conforme referido anteriormente, os metais de transição podem catalizar a formação de ROS, pelo que a sua remoção por agentes quelantes limita a sua capacidade pró-oxidante. No caso do Cu^{2+} , o aumento da capacidade de quelação deste ião pelos péptidos em função do GH está relacionado com o aumento da

concentração dos grupos carboxílicos. A quelação do Cu^{2+} pode dever-se também à maior disponibilidade nos HP de alguns aminoácidos, como a histidina.

Na figura 15 encontra-se a evolução da capacidade quelante dos HP, relativamente ao Cu^{2+} , em função da respetiva concentração. Com base nestes resultados, calculou-se os valores de EC_{50} dos HP que se apresentam na Tabela 13. Estes valores mostram que os hidrolisados HP AI e HP FI não eram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Porém, o HP AF exibiu uma maior capacidade quelante do Cu^{2+} do que os HP preparados apenas com uma das enzimas. Este resultado sugere que a adição de Flavourzyme após uma hora de hidrólise com a Alcalase terá permitido a formação de novos péptidos com maior capacidade quelante deste ião. Como controlo positivo, usou-se EDTA que, para uma concentração de 0,2 mg/mL, tinha uma capacidade quelante do Cu^{2+} de 64 %. Na comparação destes valores com os obtidos na quelação do Fe^{2+} ressaltam os valores consideravelmente mais baixos conseguidos na quelação do Cu^{2+} . Tal como referido por Kong e Xiong (2006), a menor capacidade quelante do Fe^{2+} pelos HP, em comparação com a do Cu^{2+} , pode estar relacionado com o maior número de ligações de coordenação do ião Fe^{2+} o que exigiria um maior número de moléculas de péptidos do que no caso do Cu^{2+} .

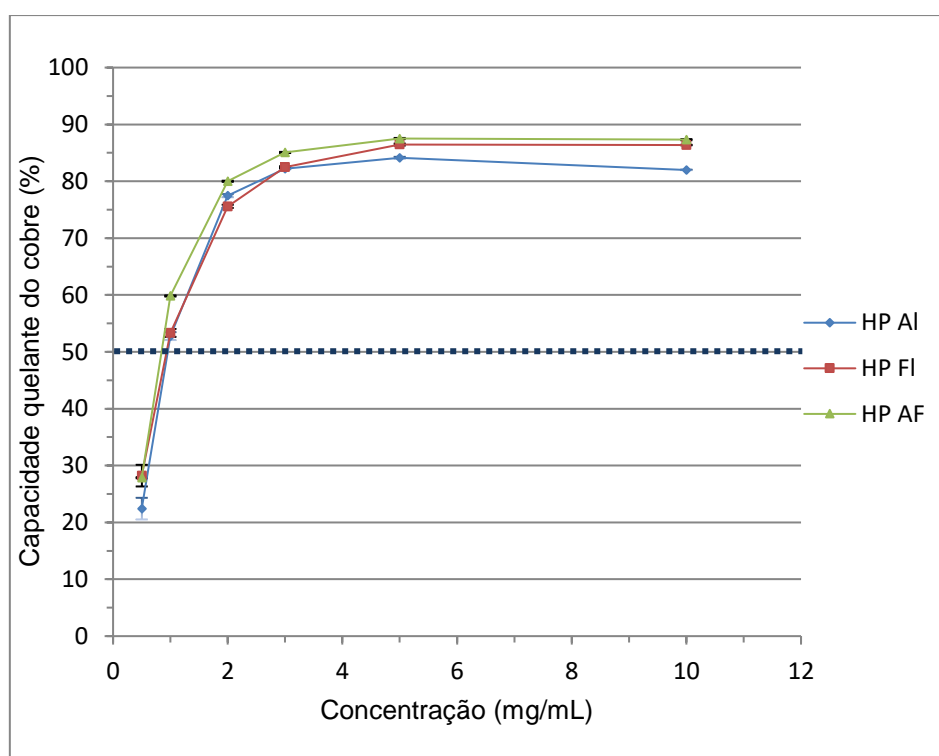


Figura 15 - Capacidade quelante do Cu^{2+} pelos hidrolisados em função das respetivas concentrações.

Tabela 13 - Valores de EC_{50} da capacidade quelante do Cu^{2+} pelos HP.

Hidrolisado	EC_{50} (mg/mL)
HP AI	$0,95 \pm 0,01^a$
HP FI	$0,93 \pm 0,01^a$
HP AF	$0,84 \pm 0,02^b$

O músculo de *loach* (*Misgurnus anguillicaudatus*), um peixe de água doce usado na medicina tradicional chinesa no tratamento de várias doenças, foi utilizado por You *et al.* (2010) na preparação de HP usando papaína. Estes hidrolisados apresentavam capacidade quelante do Cu^{2+} com um valor de EC_{50} de $2,89 \pm 0,01$ mg/mL. Noutro trabalho com esta espécie, You *et al.* (2011) procederam ao fracionamento dos hidrolisados com membranas de ultrafiltração. Estes autores verificaram que as frações com massas moleculares inferiores a 5 kDa apresentavam uma maior capacidade quelante do Cu^{2+} ($EC_{50} \approx 2$ mg/mL) do que o hidrolisado inicial ou as frações com maior massa molecular.

Os HP do músculo de raia (*Dasyatis kuhlii*) preparados com Alcalase apresentavam capacidade quelante do Cu^{2+} semelhante aos de *loach* com $EC_{50} = 2,14 \pm 0,014$ mg/mL (Chai *et al.*, 2015). Por sua vez, os hidrolisados preparados com subprodutos de pescada-do-Cabo (Teixeira *et al.*, 2016) exibiam uma capacidade um pouco mais elevada ($EC_{50} = 1,4 \pm 0,1$ mg/mL), mas inferior à registada nos HP de tilápia. Esta capacidade quelante tem sido também detetada em hidrolisados de proteínas vegetais, como a zeína. Assim, Kong e Xiong (2006) referem a obtenção de hidrolisados de zeína, preparados com Alcalase, e que apresentavam uma capacidade de quelação do Cu^{2+} de 55 % para uma concentração de hidrolisado de 3 %. Também Zhu *et al.* (2008) obtiveram hidrolisados de zeína com Alcalase que tinham uma capacidade de quelação deste ião de ca. 50 % para uma concentração de 16 mg/mL.

3.4. Capacidade de inibição da α -amilase

A α -amilase encontra-se na saliva e no suco pancreático, sendo responsável pela hidrólise de oligossacarídeos em maltose. Os efeitos hipoglicémicos e hipolipidémicos dos HP de origem animal ou vegetal têm sido associados à sua capacidade inibidora de enzimas do trato digestivo como a α -amilase (Alu'datt *et al.*, 2012, Siala *et al.*, 2016). Por conseguinte, a inibição da atividade desta enzima tem sido considerada uma abordagem adequada para controlar a obesidade e a diabetes.

Na figura VI apresenta-se o efeito da concentração dos HP do músculo de tilápia na inibição da α -amilase. A partir destes resultados, obteve-se os valores de IC_{50} dos HP

que se encontram na Tabela 14. Como se pode verificar, o hidrolisado HP AF não atingiu a inibição de 50 % da α -amilase na gama de concentrações estudada. Ressalta também a grande diferença da capacidade inibidora entre os hidrolisados HP AI e HP FI. Esta grande diferença de atividade inibidora entre estes dois hidrolisados é de atribuir, tal como no caso de outras atividades biológicas, ao menor tamanho e composição de aminoácidos dos péptidos do hidrolisado HP FI. Arise *et al.* (2016), tendo em consideração a ligeira preferência da Alcalase para hidrolisar ligações peptídicas envolvendo Trp, Tyr e Phe, admitem que a α -amilase tenderia a ligar-se a péptidos contendo estes aminoácidos na sua composição. A baixa capacidade de inibição desta enzima pelo hidrolisado HP AF sugere que a Flavourzyme teria promovido a hidrólise de péptidos formados previamente pela Alcalase, levando à formação de novos péptidos que não exibiam esta atividade biológica. Como controlo positivo, usou-se acarbose na inibição da α -amilase a qual atingiu uma inibição de 88 % para a concentração de 116 $\mu\text{g/mL}$.

Os HP preparados por Siala *et al.* (2016) a partir do músculo de cangulo-cinzento (*Balistes capriscus*) com diferentes enzimas apresentavam valores de IC_{50} muito baixos, na gama de 90 a 93 $\mu\text{g/mL}$. O valor mais baixo foi registado no HP preparado com um extrato enzimático das vísceras de sardinela-lombuda (*Sardinella aurita*). Também Salem *et al.* (2018), no estudo de inibição da α -amilase por hidrolisados de polvo (*Octopus vulgaris*) preparados com diferentes enzimas, obtiveram valores de IC_{50} entre 61,34 $\mu\text{g/mL}$ para o hidrolisado preparado com Esperase e 66,22 $\mu\text{g/mL}$ para o hidrolisado obtido com *Bacillus subtilis* A26.

Tabela 14 - Valores de IC_{50} da capacidade inibidora da α -amilase pelos HP.

Hidrolisado	IC_{50} (mg/mL)
HP AI	51,70 \pm 4,90
HP FI	6,57 \pm 0,56
HP AF	-

O número de trabalhos publicados com resultados da inibição da α -amilase por HP é muito limitado pelo que se inclui a referência ao trabalho de Arise *et al.* (2016) que mediram a atividade inibidora de HP de sementes de melancia (*Citrullus lanatus*) preparados com Alcalase. Estes autores estudaram o mecanismo de inibição destes HP e obtiveram um valor de IC_{50} de 0,149 mg/mL. Os resultados destes autores são consideravelmente mais baixos do que os obtidos no presente trabalho e podem ser

devidos às matérias-primas e enzimas utilizadas e também às condições em que decorreram as hidrólises. Porém, também o método seguido na determinação da capacidade inibidora desta enzima foi diferente, tanto em cada um dos trabalhos citados, como neste estudo. Neste sentido, refira-se que Siala *et al.* (2016) obtiveram um valor de IC_{50} para a acarbose de 13,5 $\mu\text{g/mL}$ e Salem *et al.* (2018) referem um valor de 10,73 $\mu\text{g/mL}$.

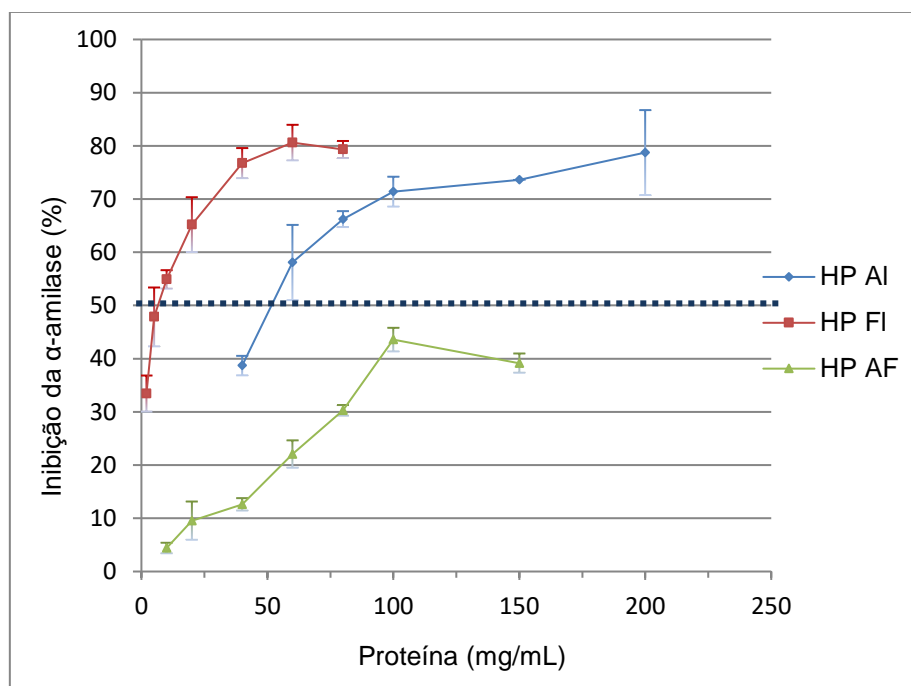


Figura 16 - Percentagem de inibição da α -amilase pelos hidrolisados em função das respectivas concentrações.

3.5. Síntese dos resultados obtidos

Na Tabela 15 apresenta-se o conjunto dos resultados do teor proteico e do GH dos HP bem como das respectivas atividades antioxidantes e inibidora da α -amilase. O teor proteico dos HP era semelhante e superior a 84 %. O maior GH foi registado no HP FI que era próximo do valor do HP AF mas destacava-se do obtido no HP AI.

No que respeita às atividades antioxidantes, verifica-se que o hidrolisado HP AI apresentava apenas menor poder redutor do que o HP FI. Este último, por sua vez, exibia maior capacidade inibidora do DPPH $^{\bullet}$ e da α -amilase e também maior capacidade quelante do Fe^{2+} . Por outro lado, o hidrolisado HP AF tinha mais capacidade inibidora do ABTS $^{+}$ e, igualmente, maior capacidade quelante do Cu^{2+} . Porém, a capacidade inibidora da α -amilase por este hidrolisado era menor do que a dos hidrolisados preparados apenas com uma enzima.

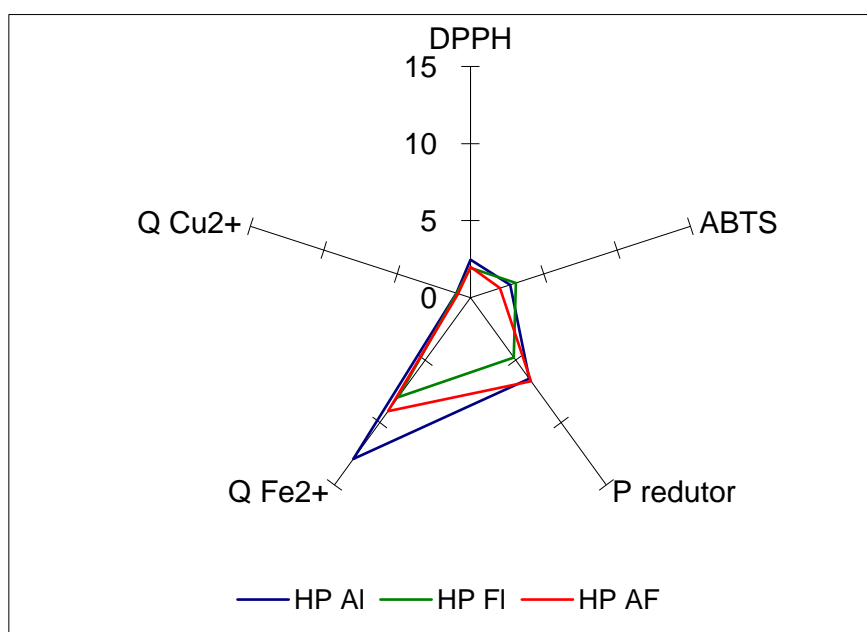
Tabela 15 - Valores do teor proteico, do GH e dos EC_{50} , $AC_{0,5}$ e IC_{50} dos HP.

		HP AI	HP FI	HP AF
Teor Proteico	%	84,1±2,1 ^a	86,1±2,0 ^a	84,1±4,5 ^a
GH	%	22,62±0,39 ^c	31,20±0,60 ^a	30,27±1,42 ^b
DPPH*	EC_{50}	2,47 ± 0,01 ^b	1,94 ± 0,05 ^a	2,00 ± 0,02 ^a
ABTS**	EC_{50}	2,72 ± 0,20 ^b	3,10 ± 0,07 ^b	2,01 ± 0,15 ^a
Poder redutor	$AC_{0,5}$	6,49 ± 0,08 ^b	4,78 ± 0,11 ^c	6,68 ± 0,07 ^a
Quel. Fe^{2+}	EC_{50}	12,92 ± 1,01 ^a	7,97 ± 0,26 ^b	9,09 ± 0,71 ^b
Quel. Cu^{2+}	EC_{50}	0,95 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,01 ^a	0,84 ± 0,02 ^b
α -amilase	IC_{50}	51,70 ± 4,90	6,57 ± 0,56	-

Na figura 17 apresentam-se os valores respeitantes à atividade antioxidante dos HP de modo a permitir uma melhor avaliação desta atividade dos HP. Assim, verifica-se uma distorção do polígono relativamente à quelação do ferro, evidenciando a maior dificuldade em quelar este ião, apresentando por conseguinte, valores de EC_{50} mais elevados. Por outro lado, a disposição dos polígonos não permite uma comparação imediata da atividade antioxidante dos HP. Assim, calculou-se a área do polígono correspondente a cada hidrolisado a qual é tanto menor, quanto maior for a atividade antioxidante. A área dos polígonos apresentava a seguinte ordem decrescente:

$$A_{HP\ AI} > A_{HP\ FI} > A_{HP\ AF},$$

significando que o hidrolisado HP AF apresentava a maior atividade antioxidante.

Figura 17 – Valores de EC_{50} e $AC_{0,5}$ dos HP.

4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Neste trabalho prepararam-se HP de subprodutos resultantes da produção de filetes de tilápia, usando Alcalase, Flavourzyme e Alcalase + Flavourzyme. Estes HP foram caracterizados no que diz respeito ao teor proteico e GH e avaliadas a atividade antioxidante por diferentes métodos e a atividade inibidora da α -amilase.

O teor proteico variou entre 84,1 % (HP AI e HP AF) e 86,1 % (HP FI).

O GH foi de $22,62 \pm 0,39$ % (HP AI), $30,27 \pm 1,42$ % (HP AF) e $31,20 \pm 0,60$ (HP FI). O valor intermédio do GH do HP AF põe em evidência a atividade da Flavourzyme, pois que este valor do GH deste hidrolisado se aproxima do atingido no HP FI.

A maior capacidade inibidora do DPPH[•] foi registada nos hidrolisados HP FI e HP AF ($EC_{50} = 1,94 \pm 0,05$ mg/mL e $2,00 \pm 0,02$ mg/mL), evidenciando também o contributo relevante dos péptidos resultantes da hidrólise pela Flavourzyme.

O hidrolisado HP AF exibia a maior capacidade inibidora do ABTS^{•+} ($EC_{50} = 2,01 \pm 0,15$ mg/mL). Esta maior capacidade inibidora deste hidrolisado sugere a formação de uma maior percentagem de péptidos hidrofílicos pela Flavourzyme a partir de péptidos previamente formados com a Alcalase.

Este hidrolisado (HP AF) apresentava o menor poder redutor ($AC_{50} = 6,68 \pm 0,07$ mg/mL), demonstrando que a hidrólise com a Flavourzyme não contribuiu para a formação de novos péptidos exibindo esta atividade.

As maiores atividades quelantes do Fe^{2+} registaram-se nos hidrolisados HP FI e HP AF ($EC_{50} = 7,97 \pm 0,26$ mg/mL e $9,09 \pm 0,71$ mg/mL, respetivamente) e podem estar relacionadas com o menor tamanho médio dos péptidos destes hidrolisados.

O hidrolisado HP AF tinha também a maior capacidade quelante do Cu^{2+} ($EC_{50} = 0,84 \pm 0,02$ mg/mL), evidenciando do mesmo modo a ação positiva da Flavourzyme na formação de péptidos com maior atividade quelante deste ião.

O hidrolisado HP FI exibia a maior capacidade inibidora da α -amilase ($EC_{50} = 6,57 \pm 0,56$ mg/mL), enquanto esta atividade do hidrolisado HP AF apresentava valores relativamente baixos.

De um modo geral, podemos concluir que a preparação de HP em dois passos, isto é, hidrólises sucessivas com Alcalase e Flavourzyme, permitiu obter hidrolisados com maior atividade antioxidante. Em contrapartida, o hidrolisado preparado por este processo (HP AF) apresentava uma atividade inibidora da α -amilase consideravelmente mais baixa do que os HP obtidos com as enzimas isoladas.

Os resultados obtidos neste estudo permitem perspetivar o seguinte trabalho futuro de modo a clarificar o efeito da ação hidrolítica das enzimas usadas e a melhorar a caracterização e avaliação de outras atividades biológicas:

- Preparação dos HP em dois passos, iniciando o processo com Flavourzyme, seguindo-se a adição de Alcalase;
- Preparação dos HP com a mistura das duas enzimas;
- Caracterização do perfil peptídico dos HP preparados;
- Avaliação de outras atividades biológicas, tal como a capacidade de inibição da ACE (Enzima Conversora da Angiotensina I);
- Avaliação da estabilidade dos HP durante o processo de digestão *in vitro*.

5. Referências Bibliográficas

- Abdelhedi, O., Jridi, M., Jemil, I., Mora, L., Toldrá, F., Aristoy, M.-C., Boualga, A., Nasri, M., Nasri, R. (2016). Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Research International*, 86:9–23.
- Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Mora, L., Oseguera-Toledo, M.E., Aristoy, M.-C., Amara, I.B., Toldrá, F., Nasri, M. (2017). In silico analysis and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysate: Enzyme-peptide interaction study using molecular docking simulation. *Process Biochemistry*, 58: 145-159.
- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, Ltd. Barking, Essex, UK. 427p.
- Ahn, C.-B., Je, J.-Y., Cho, Y.-S. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49(1):92-98.
- Ahn, C.-B., Kim, J.-G., Je J.-Y. (2014). Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 147:78–83.
- Aleman, A., Perez-Santin, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gomez-Guillen, M. C., Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44, 1044–1051.
- Alu'datt, M.H., Ereifej, K., Abu-Zaiton, A., Alrababah, M., Almajwal, A., Rababah, T., Yang, W. (2012). Anti-Oxidant, Anti-Diabetic, and Anti-Hypertensive Effects of Extracted Phenolics and Hydrolyzed Peptides from Barley Protein Fractions, *International Journal of Food Properties*, 15:4, 781-795.
- Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L. Zhou, H. M., 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *International Food Research Journal*, 20(5): 2081-2090.
- Arise, R. O., Yekeen, A. A., Ekun, O. E. (2016). *In vitro* antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. *Environmental and Experimental Biology*, 14: 163–172.

- Atrooz, O.M. (2009). The antioxidant Activity and Polyphenolic Contents of Different Plant Seeds Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12 (15): 1063-1068.¹⁵
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. (2006). Stresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29 (1):113-123.
- Batista, I. (2011). Hidrolisados proteicos de pescado. Atheneu (Ed.), In *Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação*. Alex Augusto Gonçalves, São Paulo, pp. 386-398.
- Batista, I. (2013). Biological Activities of Fish-protein Hydrolysates. In *Marine Proteins and Peptides*. Kim S-K (Ed), John Wiley & Sons, Ltd, UK (p.111-127).
- Batista, I. Pires, C. (2014). Estudo de viabilidade da produção de hidrolisados proteicos de pescado. Instituto Português do Mar e da Atmosfera.
- Batista, I., Pires, C., Nunes, M.L. (2006). Hidrolisados proteicos de pescado – Preparação, propriedades e utilizações. *Publicações avulsas do IPIMAR*, 14: 32p.
- Bernardi, D.M., Paris, D.L., Dieterich, F., Silva, F.G.D., Boscolo, W.R., Sary, C., Signor, A., Bertol, T.M., Sgarbieri, V.C. (2016). Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 36(4):709-716.
- Bhumiratana, S., et al. (1977). Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. *Journal of Food Science*, 42 (4):1016-1021.
- Bkhairia, I., Salem, R.B.S.B., Nasri, R., Jridi, M., Ghorbel, S., Nasri, M. (2016). *In-vitro* antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7): 2902-2912.
- Bouhallab, S., Touzè, C. (1995). Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Lait*, 75: 251-8.
- Bulhões, C.F. (2013). Produção e caracterização de hidrolisados proteicos de pescado (HPP) a partir de subprodutos de cavala (*Scomber colias*). Tese de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, 49p.

- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S., Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*, 16:234–242.
- Cellus, I., Brijs, K., Delcour, J.A. (2007). Enzymatic hydrolysis of brewers spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Agricultural and Chemistry*, 55:8703-8710.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Dinesh Kumar, B. (2015). Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5817-5825.
- Chalamaiah, M., Yu, Wenlin., Wu, Jianping. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*, 245: 205-222.
- Cheerawit, R., Thunwadee, T.S., Duangporn, K., Tanawat, R., Wichuda, K. (2012). Biogas production from co-digestion of domestic wastewater and food waste. *Health and The Environment Journal*, 3(2).
- Cheftel, C. (1972). Solubilisation enzymatique continue du concentré protéique de poisson; essai de recyclage des enzymes. *Annales de technologie agricole*, 21(3):423-433.
- Chen, D., Liu, Z., Huang, W., Zhao, Y., Dong, S., Zeng, M. (2013). Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 5: 689-697.
- Chen, X., Hu, X., Li, L., Yang, X., Wu, Y., Lin, W., Zhao, Y., Ma, H., Wei, Y., (2015). Antioxidant properties of tilapia component protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Advanced Materials Research Vols*, 1073-1076: 1812-1817.
- Chiang, W.-D., Tsou, M.-J., Tsai, Z.-Y., Tsai, T.-C. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, 98: 725-732.
- Chi, C.F., Wang, B., Hu, F.Y., Wang, Y.M., Zhang, B., Deng, S.G., Wu, C.W. (2015a). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*, 73:124–129.

- Chi, C.F., Wang, B., Wang, Y.M., Zhang, B., Deng, S.G. (2015b). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*, 12:1–10.
- Chidichima, A.C. (2014). Tilapia industrialization: adding value chain for an family farming. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil, 86p.
- Choi, Y. J., Hur, S.; Choi, B. D.; Konno, K.; Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, Champaign, 74(1):C17-C24.
- Choopicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N., Niamsup, H. (2015) Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile Tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5): 3134-3139.
- Chuang, W-U., Pan, B.S., Tsai, J.S. (2000). Inhibition of lipoxygenase and blood thinning effects of mackerel protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 24: 333-343.
- Cross, K. J., Huq, N. L., Reynolds, E. C. (2007). Casein phosphopeptides in oral healthchemistry and clinical applications. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8):793–800.
- Daud, N'A., Babji, A.S., Yusop, S.M. (2014). Antioxidant activities of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates as influenced by thermolysin and alcalase. The 2013 UKM FST Postgraduate Colloquium. AIP Conference Proceedings 1571, 687-691.
- Daud, N'A., Babji, A.S., Yusop, S.M. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on the antioxidative and antihypertensive activities from red tilapia fish protein. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 5(4): 387.
- Decker, E., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38(3): 674-677.
- Dong, Y., Sheng, G., Fu, J., Wen, K. (2005). Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12):2033-2039.

- Ennaas, N., Hammami, R., Beaulieu, L., Fliss, I. (2015). Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462:195–200.
- Fan, J., He, J., Zhuang, Y., Sun, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. *Molecules*, 17: 12836-12850.
- Foh, M.B.K., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T., Xia, W. (2010). Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4): 1851-1869.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso 01/04/2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). Global aquaculture production. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>. Acesso 15/04/2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation (2018). Cultured aquatic species information program: *Oreochromis niloticus*. Disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en. Acesso 8/07/2018.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5): E359-E86.
- Fitzgerald, A.J., Rai, P.S., Marchbank, T., Taylor, G.W., Ghosh, S., Ritz, B.W., Playford, R.J. (2005). Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut*, 54(6):775-781.
- García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., M. Bandarra, M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., M. Guadix, E. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65: 469-476.

- García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Muñío, M.M., Guadix, A., Guadix, E.M. (2013). Lipid characterization and properties of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species, 93(15): 3777-84. Journal of Food Science and Technology.
- Geirsdottir, M., Sigurgisladottir, S., Hamaguchi, P.Y., Thorkelsson, G., Johannsson, R., Kristinsson, H.G., Kristjansson, M.M. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*); functional and bioactive properties. Journal of Food Science, 76(1).
- Gertsch, J., Viveros-paredes, J. M., Taylor, P. (2011). Plant immunostimulants scientific paradigm or myth? Journal of Ethnopharmacology, 136:385–391.
- Globefish Highlights: A quarterly update on world seafood markets. (2016) Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Godinho, I. (2013) - Production of fish protein hydrolysates by a marine proteolytic strain. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa 87p.
- Godinho, I., Pires, C., Pedro, S., Teixeira, B., Mendes, R., Nunes, Batista, I. (2016). Antioxidant Properties of Fish Protein Hydrolysates Prepared from Cod Protein Hydrolysate by *Bacillus* sp. Applied Biochemistry and Biotechnology Journal, 178(6):1095-112.
- Goldstein, B. J. (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. The American Journal of Cardiology, 90(5):3–10.
- Guadix, A., Guadix, E.M., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P., Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharmaceutica, 41:1, 79-89.
- Guadix, A., Camacho, F., Guadix, E.M. (2006). Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. Journal of Food Engennering, 72:398-405.
- Guastadisegni, C., Nicolini, A., Balduzzi, M., Ajmone-Cat, M.A., Minghetti, L. (2002). Modulation of pge2 and tnfa by nitric oxide in resting and lps-activated raw 264.7 cells. Cytokine, 19:175–180.

- Guerard, F. (2007) Enzymatic methods for marine by-products recovery. F. Shahidi (Ed.), In Maximising the value of marine by-products. Woodhead Publishing Limited: University of Western Brittany, France, pp.107-134.
- Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S., Zhao, X. (2013). Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. *Process Biochemistry*, 48: 988-993.
- Grogan, J., McKnight, C.J., Troxler, R.F., Oppenheim, F.G. (2001). Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Letters* 491, 76-80.
- Hansawasdi, C., Kawabata, J., Kasai, T. (2000). α -Amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn). *Tea, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64:5, 1041-1043.
- Harnedy, P.A., Parthasarathy, V., McLaughlin, C.M., C., O'Keeffe, M.B., Allsopp, J.P., McSorley, E.M., O'Harte, F.P.M., FitzGerald, R.J. (2018). Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. *Food Research International*, 106: 598-606.
- Himaya, S.W.A., Ngo, D.H., Ryu, B., Kim, S.K. (2012). An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry*, 132:1872–1882.
- Hoyle, N.T., Merritt, J.H. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1):76-79.
- Hsu, K.C., Li-Chan, E.C.Y., Jao, C.L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126:617–622.
- Hung, C.C., Yang, Y.H., Kuo, P.F., Hsu, K.C. (2014). Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*, 11:563–570.
- Intarasirisawat, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135 (4): 3039-3048.

- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Wu, J., Visessanguan, W. (2013). Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from proteinhydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods*, 5(4):1854–1862.
- Jao, C.-L., Ko, W.-C. (2002). Utilization of cooking juice of young tuna processed into canned tuna as condiments: Effect of enzymatic hydrolysis and membrane treatment. *Fisheries Science*, 68(6): 1344-1351.
- Je, J.-Y., Lee, K.-H., Lee, M.H., Ahn, C.-B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42: 1266-1272.
- Jemil, I., Abdelhedi, O., Nasri, R., Mora, L., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Elfeki, A., Hajji, M., Toldrá, F., Nasri, M. (2017). Hypolipidemic, antiobesity and cardioprotective effects of sardinelle meat flour and its hydrolysates in high-fat and fructose diet fed Wistar rats. *Life Sciences*, 176:54-66.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, RBS., Mehiri, M., Hajji, M., Nasei, M. (2014). Functional, antioxidante and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49:963-972.
- Jiang, L., Wang, B., Li, B., Wang, C., Luo, Y. (2014). Preparation and identification of peptides and their zinc complexes with antimicrobial activities from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. *Food Research International*, 64: 91–98.
- Jung, W.-K., Karawita, R., Heo, S.-J., Lee, B.-J., Kim, S.-K., Jeon, Y.-J. (2006a). Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry* 41: 2097–2100.
- Jung, W.-K., Lee, B.-J., Kim, S.-K. (2006b). Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *British Journal of Nutrition*, 95: 124–128.
- Karnjanapratum, S., C O’Callaghan, Y., Benjakul, S., O’Brien, N. (2016). Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatina hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(9): 3220–3226.

- Kim, E. K., Kim, Y., Hwang, J., Kang, S. H., Choi, D., Lee, K., Park, P. (2013). Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 1416–1420.
- Kim, S.K., Wijesekara, I. (2010). Development and Biological Activities of Marine-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Journal of Functional Foods*, 2:1-9.
- Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., Je, J.-Y. (2016). Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS induced RAW264.7 macrophage via NF- κ B and MAPK pathways. *Food Chemistry*. 202: 9-14.
- Ko, J.-Y., Kang, N., Lee, J.-H., Kim, J.-S., Kim, W.-S., Park, S.J., Kim, Y.-T., Jeon, Y.-J. (2016). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agente. *Process Biochemistry*, 51:535-541.
- Kristinsson, H.G. (2007). Aquatic food protein hydrolysates. F. Shahidi (Ed.), *In Maximising the value of marine by-products*. Woodhead Publishing Limited: University of Florida, USA, pp.229-248.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Food Science and Nutrition*, 40(1):43-81.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J., Hubinger, M.D. (2009). Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (3):557-566.
- Lan, X., Liao, D., Wu, S., Wang, F., Jianhua, S., Tong, Z. (2015). Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation. *Food Chemistry*, 182:136–142.
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M., Barkia, A., Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatina hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 13:225–238.
- Lee, S.Y., Hur, S.J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228:506-517.

- Letícia, H.H. (2015). Produção, caracterização nutricional e utilização de farinhas e óleos de resíduos de peixes neotropicais em dietas para Tilápia do Nilo. Tese de pós graduação em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista – Centro de Aquicultura da UNESP, Brasil, 105p.
- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.L., Jao, C.L., Ho, K.P., Hsu, K.C. (2012). Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:973–978.
- Lin, C. C., Liang, J. H. (2002). Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. *Journal of Food Science*, 67:530–533.
- Liu, L., Wang, Y., Peng, C., Wang, J. (2013). Optimization of the preparation of fish protein anti-obesity hydrolysates using response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 3124-3139.
- Mackie, I.M. (1982). Fish protein hydrolysates. *Process biochemistry*, 17(1): 26-31.
- Maret, W., Krezel, A. (2007). Cellular zinc and redox buffering capacity of metallo thionein/ thionein in health and disease. *Molecular Medicine*, 13:7-8.
- Martinez-Alvarez, O., Guimas, L., Delannoy, C., Fouchereau-Peron, M. (2007). Occurrence of a CGRP-like molecule in siki (*Centroscymnus coelolepsis*) hydrolysate of industrial origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14): 5469-5475.
- Martinez-Alvarez, O., Guimas, L., Delannoy, C., Fouchereau-Peron, M. (2008). Use of a commercial protease and yeasts to obtain CGRP-like molecules from saithe protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17): 7853-7859.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Philosoph-Hadas, S., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (7): 1813-1819.
- Ministério da Pesca e aquicultura (MPA). Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasília, 2013. 60p.
- Miquel, E., Farre, R. (2007). Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3): 139–143.

- Mizushige, T., Komiya, M., Onda, M., Uchida, M., Hayamizu, K., Kabuyama Y. (2017). Fish protein hydrolysate exhibits anti-obesity activity and reduces hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA expressions in rats. *Biomedical research*, 38(6): 351-357.
- Muzaifa, M., Fahrizal, F., Safriani, N. (2011). Physicochemical properties of fish protein hydrolysates prepared from fish by-product using Alcalase and Flavourzyme enzyme. *Jurnal Biologi Edukasi*, 3(2):5-8.
- Ng, W.K., Romano, N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, 5 pp. 220-254.
- Najafian, L., Babji, A.S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1):178-185.
- Najafian, L., Babji, A.S. (2015). Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1): 452-461.
- Nascimento, J.C, Lage, L.F.O., Camargos C.R.D., Amaral, J.C., Costa, L.M., Sousa, A.N., Oliveira, F.Q. (2011). Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. Brazilian. *Journal of Pharmacy*, 92(4):327-332.
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Nasri, M., Karra-Châabouni, M. (2013). ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54:552-561.
- Ngo, D.H., Ryu, B., Kim, S.K. (2014). Active peptides from skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-I converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. *Food Chemistry*, 143:246–255.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66 (5) 642–646.
- Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., Fujimaki, M. (1975). Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(1): 49 –53.

- Nosho, Y., Otagiri K., Shinoda, I., Okai, H. (1985). Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. II. Bitterness behavior of a tetrapeptide (Arg-Pro-Phe-Phe) and its derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(6):1829–1837.
- Nunes, O.L.G.S., Signor, A., Fiorese, M.L., Baraldi, I.J., Cottica, S., Finkler, J.K., Dalposso, P., Nardino, D. (2016). Capacidade antioxidante em hidrolisado de tilápia do Nilo. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
- Ogurtsova, K., Fernandes, J.D.R., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E., Makaroff, L.E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128: 40-50.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27:269–273.
- Oseguera-Toledo, M. E., Mejía, E. G., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides. Mechanisms of action on diabetes management. *Nutrafoods*, 13:147–157.
- Oyaizu, M. (1988). Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35:771-775.
- Pádraigín, H., FitzGerald, R. (2013). Bioactive proteins and peptides from macroalgae, fish, shellfish and marine processing waste. S.K. Kim (Ed.), *In Marine proteins and peptides: biological activities and applications*. USA: Wiley-Blackwell publisher, pp.5-39.
- Pan, X., Zhao, Y.Q., Hu, F.Y., Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25:220–230.
- Pires, C., Batista, I. (2013). Functional properties of fish protein hydrolysates. R. Pérez-Gálvez, J.P. Bergé (Eds.), *In Utilization of Fish Waste*. CRS Press, Boca Raton, FL, pp.59-75.
- Peters, B.M., Shirliff, M.E., Jabra-Rizk M.A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLOS Pathog*, v.6(10).

- Picot, L., Ravallec, O., Fouchereu-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., LeGal, Y., Alvarez, O.M., Bergé, J.-P., Piot, J.-M., Batista, I., Pires, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., Bourseau, P. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11): 1819-1826.
- Pires, C., Teixeira, B., Cardoso, C., Mendes, R., Nunes, M.L., Batista, I. (2015). Cape hake protein hydrolysates prepared from alkaline solubilised proteins pre-treated with citric acid and calcium ions: Functional properties and ACE inhibitory activity. *Process Biochemistry*, 50: 1006-1015.
- Pires, C., Clemente, T., Batista, I. (2013). Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4):771-80.
- Promintzer, M., Krebs, M. (2006). Effects of dietary protein on glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(4):463–468.
- Raghavan, S., Kritinsson, H.G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 117: 582-588.
- Rajanbabu, V., Chen, J.Y. (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2):415-20.
- Ravallec-Plé, R., Gilmartin, L., Wormhoudt, A.V., Gal, Y.L. (2000). Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 2176-2180.
- Ravallec-Plé, R., Wormhoudt, A.V. (2003). Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 134: 669–679.
- Ravi Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1):1-27.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.

- Reantaso, M.B. (2017). Tilapialake virus (TiLV) caused by an orthomyxo-like virus (Family Orthomyxoviridae) threatening cultured and wild stocks of tilapia. *FAO Aquaculture Newsletter*, 57, pp. 9-11
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Corguillé, G.L., Bernay, B., Henry, J. (2015). Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and *in vitro* evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*, 50: 487-492.
- Roh, C., Jung U. (2012). Screening of Crude Plant Extracts with Anti-Obesity Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 1710-1719.
- Roslan, J., Kamal, S.M.M., Yunos, K.F.M., Addullah, N. (2018). Evaluation on performance of dead-end ultrafiltration membrane in fractionating tilapia by-product protein hydrolysate. *Separation and Purification Technology* 195, 21-29.
- Roslan, J., Yunos, K.F.M., Addullah, N., Kamal, S.M.M. (2014). Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2:312 – 319.
- Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:3661-3667.
- Sampath Kumar, N.S., Nazeer, R.A., Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*, 42:1641–1649.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 21(10):1949-56.
- Santos, M.F. (2011). Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – Aplicações. Tese de Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos. Instituto Politécnico de Leiria, 69p.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., Bechtel, P.J. (2005). Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70:401-406.

- Sbroggio, M.F., Montilha, M.S., Figueiredo, V.R.G., Georgetti, S.R., Kurozawa, L.E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2): 375-381.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2007). Antioxidants from marine by-products. . F. Shahidi (Ed.) In *Maximising the value of marine by-products*. Woodhead Publishing Limited: Cambridge England: CRC Press, pp.397-412.
- Shamloo, M., Bakar, J., Mat Hashim, D., Khatib, A., (2012). Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal* 19(1): 183-188.
- Sherwin E. R. (1990). Antioxidant. *In*: Branen A.L., Davidson P. M., Salminen S. (eds). *Food Additives*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 139-193.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6):945-948.
- Siala, R., Khabir, A., Lassoued, I., Abdelhedi, O., Elfeki, A., Vallaes, T., Nasri, M. (2016). Functional and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates from Grey Triggerfish Muscle and *in vivo* Evaluation of Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(6):105-119.
- Silva, M.C. (2016). Extração, caracterização e hidrólise enzimática do colagénio da pele do peixe-espada-preto. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa 68p.
- Sila, A., Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21:10-26.
- Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.S., Araújo, D.S. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2): 351-355.
- Srikanya, A., Dhanapal, K., Sravani, K., Madhavi, K., Praveen Kumar, G. (2017). A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic hydrolysis from tilapia fish waste mince. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12): 3220-3229.

- Suwal, S., Ketnawa, S., Liceaga, A.M., Huang, J.-Y. (2018). Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45:122-131.
- Sucasas, L.F.A. (2011). Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva. Tese de Doutorado em Ciências na área da concentração: Energia Nuclear na Agricultura e Ambiente. Universidade de São Paulo, 163 pp.
- Sung, N.-Y., Jung, P.-M., Yoon, M., Kim, J.-S., Choi, J., Jeong, H.G., Lee, J.-W., Kim, J.-H. (2012). Anti-inflammatory effect of sweetfish-derived protein and its enzymatic hydrolysate on LPS-induced RAW264.7 cells via inhibition of NF- κ B transcription. *Fisheries Science*, 78, 381–390.
- Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168:115–123.
- Teixeira, B., Pires, C., Nunes, M. L., Batista, I. (2016). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of hydrolysates prepared from Cape-hake by-products proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 51: 2528–2536.
- Tejpal, C.S., Vijayagopal, P., Elavarasan, K., Linga Prabu, D., Lekshmi, R.G. K., Asha, K.K., Anandan, R., Chatterjee, N.S. (2017). Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. *Journal of Food Science and Technology*, 54(13): 4257-4267.
- Téllez, G.A., Castanõ, J.C. (2010). Antimicrobial peptides. *Infectio*, 14(1): 55-67.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129: 485-490.
- Theodore, A.E., Raghavan, S., Kristinsson, H.G. (2008). Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16): 7459-7466.

- Thongthai, C., Gilberg, A. (2005). Bioactive properties of fish protein hydrolysates at varyin degrees of hydrolysis made from catfish protein isolates. In: Asian Functional Foods, New York, Marcel Deckker Inc., 215-265.
- Thuanthong, M., Gobba, D.G., Sirinupong, N., Youravong, W., Otte, J. (2017). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatine produced by na enzymatic membrane reactor. Journal of Functional Foods, 36: 243-254.
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chemistry, 205: 221-8.
- Wang, Y.-K., He, H.-L., Wang, G.-f., Wu, H., Zhou, B.-c, Chen., X.-l, Zhang, Y.-Z. (2010). Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. Marine Drugs, 8(2): 255–268.
- Wang, T.-Y., Hsieh, C.-H, Hung, C.-C, Jao, C.-L., Chen, M.-C, Hsu, K.-C. (2015). Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm-and cold-water fish. Journal of Functional Foods 19:330-340.
- Wang, W., Li, Z., Liu, J.-Z, Wang, Y.-J, Liu, S., Sun, M. (2013). Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. Czech Journal of Food Sciences, 31(1):1-4.
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. (2008). Functional Properties of Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*), Nile Perch (*Lates Niloticus*) and Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Skin Hydrolysates. International Journal of Food Properties, 11(2): 339-350.
- Windsor, M., Barlow, S. (1981). Introduction to fishery by-products (Ch. V Fish silage; Ch. VI Hydrolysed fish products). Fishing News Books.
- Weng, W., Tang, L., Wang, B., Chen, J., Su, W., Osako, K., Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. Journal of Functional Foods 11:342–351.
- Wisuthiphaet, N., Kongruang, S. (2015). Production of fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. Journal of Medical and Bioengineering, 4(6).

- Wu, J., Aluko R. E., & Muir, A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950 (1-2), 125-130.
- Wu, S., Feng, X., Lan, X., Xu, Y., Liao, D. (2015). Purification and identification of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) hydrolysate. *Journal of Funcional Foods*, 13:295-299.
- Udeniqwe, C.C., Aluko, R.R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1):R11-24.
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., Balasubramanian T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4:343-353.
- Uraipong, C. and Zhao, J. (2016). Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α -amylase, β -glucosidase and ACE-inhibition activities. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 96: 1101-1110.
- Veit, J.C., Malut, M.L.F., Simões, M.R., Feiden, A., Bscolo, W.R. (2012). Inclusão de hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em empadas de peixe. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, Umuarama*, 16 (2)-85-92.
- Venugopal, V., Alur, M.D., Nerkar, D.P. (1989). Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(9): 1098-1103.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacterium as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of food microbiology*, 96(2): 149-64.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H.G., Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Journal of Food Sciece and Technology*, 52(6): 3336-3349.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., Prentice, C. (2017). Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. *Journal of Marine Biotechnology*, 20(2):118-130.

- Zhang, R., El-Mashad, H. M. (2007). Bio-diesel and bio-gas production from seafood processing by-products. F.Shahidi (Ed.), *In Maximising the value of marine by-products*. Woodhead Publishing Limited: University of California Davis, USA, pp. 460-482.
- Zhang, Y., Duan, X., Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatina. *Peptides*, 38: 13-21.